

FAKTORIELLE POLLENLETALITÄT*

Von

ROBERT LINDER

Mit 6 Textabbildungen

(Eingegangen am 1. Dezember 1960)

Das Pollenbild ist nicht nur wesentliches Hilfsmittel zur Artendiagnose, sei es um hybride oder polyploide Typen festzustellen, sondern es erweckt auch Interesse als Objekt der Gametophytengenetik. In der folgenden Abhandlung erfassen wir das Pollenbild der gametophytischen Aufspaltung, welche zwei Gonenklassen aufweist; die eine besteht aus normalem, funktionsfähigem Blütenstaub, die andere aus verkümmertem, nicht keimfähigem. Im einfachsten Falle beträgt die Antherenpopulation 50 % gute und 50 % schlechte Körner und erscheint so als Produkt der Reduktionsteilung einer heterozygoten $+/p$ -Pflanze, wo ein $+$ -Faktor, der normales Pollenkorn bedingt, von seinem letalen p -Allel getrennt wird; der p -Faktor induziert Pollenabort.

Bekannte Fälle faktorieller Pollenletalität sind nicht sehr häufig; zudem steht nicht immer fest, daß die Letalität durch einen Mendelfaktor hervorgerufen wird, besonders wenn es sich um hybride Pflanzen handelt (BELLING). Deshalb muß vorerst der Beweis einer normalen Meiosis mit n -Bivalenten und regelmäßiger Tetradenbildung erbracht werden, denn Translokation kann auch zur Hälfte guten und zur Hälfte leeren Blütenstaub erzeugen. Bei Mais wurde ein pa -Faktor entdeckt (*pollen abortion*, BURNHAM 1941), bei *Oenothera organensis* ein pl -Faktor (*pollen letal*, EMERSON 1941), bei *Datura stramonium* nach Bestrahlung die lp -, sb - und s -Faktoren (BUCHHOLZ and BLAKESLEE 1936); schließlich ist Gonenletalität eine Charakteristik der Nachtkerzen geworden.

Die zwei Gametenklassen können in andern Proportionen wie $1/1$ auftreten. Wenn Pollenabort durch zwei Genpaare bedingt wird, so beträgt das Pollenbild $3/4$ gute und $1/4$ schlechte Körner, wie z.B. bei *Galeopsis tetrahit* (MÜNTZING 1929). Es kann auch sein, daß nur $1/6$ des Blütenstaubs leer ist, so beim Duplexgenotyp $(++pp)$ einer tetraploiden Pflanze.

Der p -Faktor bei Apfel und Birne

Eine gründliche Untersuchung der Pollenletalität wurde durch A. GAGNIEU beim kultivierten Apfel unternommen. Unter den 300 Apfelvarietäten, die in der „Collection du Centre de Recherches Agronomiques“ in Clermont-Ferrand gesammelt sind, befinden sich 15 mit Pollensegregation. Diese 15 Apfelsorten sind alle diploid, zeigen normale Meiosis mit 17 Bivalenten und wurden von 1945—1955, Jahr für Jahr, zur wiederholten Beobachtung herangezogen. Es entpuppten sich 4 verschiedene Pollenletalfaktoren (p_1 , p_2 , p_3 und p_4), die alle zur $1/1$ -Aufspaltung in der Antherenpopulation führen.

p_1 wurde in der Varietät „*Réale d'Entraigues*“ gefunden; er stoppt frühzeitig die Synthesetätigkeit des Cytoplasmas; die Mikrospore verkümmert schnell und wird leer. Bei der Anthese zeigt das Pollenbild 50 % volle Körner und 50 % leere Hüllen.

p_2 äußert sich durch partielle Wachstumshemmung, die hauptsächlich auf die Stärkesynthese nachteilig wirkt; das Pollenbild zeigt 50 % normale und 50 % kleinere, gräuliche,

* Herrn Professor Dr. F. OEHLKERS zum 70. Geburtstag gewidmet.

nicht keimfähige Körner. p_2 wurde bei 4 Varietäten festgestellt: „*Bouquepreuve, Pouzac, Reinette verte, Transparente de Croncels*“.

p_3 offenbart sich als Wachstumsinhibitor, der schwächer wirkt als p_1 und p_2 ; es kommt zu einer Verlangsamung der Syntheseprozesse; schließlich ist das Korn unfähig, die Stärke in Zucker umzusetzen. Die p_3 -Körner sind insgesamt kleiner als die normalen, jedoch von verschiedener Größe und mit ungleichem Inhalt. Dieser Letalfaktor wurde in folgenden Sorten gefunden: „*Champ Gaillard, Chataignier de Seine et Marne, Double rose, Germaine de la Loire, Laurier, Pomme à côtes, Pomme Demoiselle, Racine blanche, Vernajoux*“.

p_4 ist nicht im Pollenbild der Anthese sichtbar; erst in Kultur auf Zuckeragar wird festgestellt, daß die Hälfte des normalaussehenden Pollens nicht keimt. Es ist der Fall für die Varietät „*Carrey*“.

Diese Ergebnisse bei kultivierten Apfelbäumen veranlaßten uns, die wilden Pomoideen im Oberelsaß zu untersuchen. In der Colmarer Trockeninsel beherbergen die verschiedenen „Wädele“ der Rheinebene zwischen Hettenschlag und Ensisheim sehr viele Obstbäume. Seit 1952 besichtigen wir jedes Jahr die wilden Apfel- und Birnbäume folgender Gemarkungen: D (Dessenheim), H (Hettenschlag), M (Merxheim), O (Oberhergheim), R (Rotläuble). Es wurde die Regelmäßigkeit der Meiosis untersucht, das Pollenbild beobachtet, wenn nötig ausgezählt, die Keimfähigkeit auf 12%igem Zuckeragar geprüft. Diese Untersuchungen begannen unter gutem Omen: der erste untersuchte Baum (Apfel R_1) zeigte Pollensegregation. Unter 900 bis jetzt beobachteten Bäumen (davon 250 Birnen) fanden sich 15 mit faktorieller Pollenletalität; sie verteilen sich folgendermaßen:

p_1 : 1 Birne (O_{27}) und 3 Apfel (H_{193} , H_{233} , H_{329})

p_2 : 1 Birne (H_{164}) und 6 Apfel (O_6 , H_{246} , H_{326} , H_{355} , H_{473} , H_{477})

p_3 : 1 Birne (D_{26}) und 3 Apfel (D_{16} , R_1 , R_{15}).

Die Entdeckung des p_4 -Faktors ist viel schwieriger; er konnte noch nicht zu verlässig festgestellt werden.

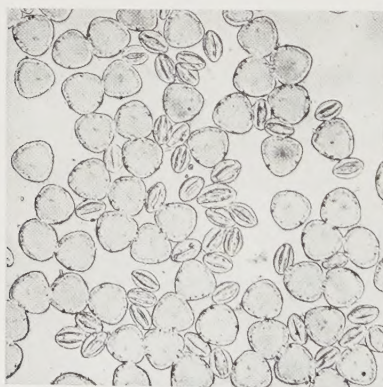


Abb. 1. Pollenbild von Birne O_{27} .
1/1-Aufspaltung von normalen und leeren
 p_1 -Körnern

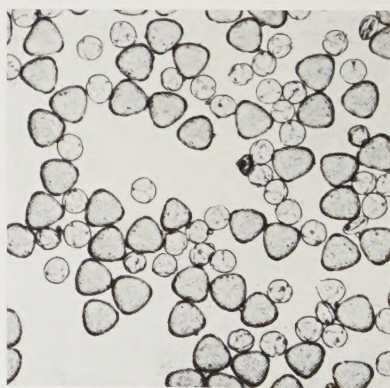


Abb. 2. Pollenbild von Apfel H_{233} .
1/1-Aufspaltung von normalen und leeren
 p_1 -Körnern

Die Gonenaufspaltung wird ersichtlich, wenn man durch Auszählung den Anteil guten Pollens festlegt. Hierbei verfährt man in zweifacher Weise: einmal zählt man eine große Zahl von Körnern einer Blüte (2000—3000 Körner); zum andern vervielfältigt man die Werte, indem man nur 225 Körner aus einem Staubblatt je Blüte auszählt. Beides wiederholt man während mehrerer Blühperioden. Beim zweiten Verfahren trägt man die Prozentwerte der normalen Körner zu

einem Histogramm auf. Das Gesamtbild der Werte ergibt eine Gaussche Binomialverteilung, die dem Statistiker merkwürdig erscheint: anstatt sich bis zur $\pm 3\sigma$ -Grenze auszudehnen, ist die Verteilung bis innerhalb $\pm 2\sigma$ beiderseits des Mittelwertes eingengt. Diese Erscheinung ist der gametophytischen Segregation eigen: sie beruht lediglich auf Musterstreuung (échantillonnage) im Präparat.

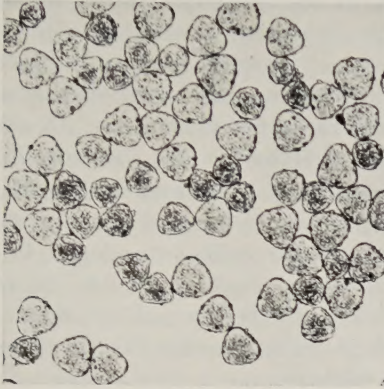


Abb. 3. Pollenbild von Apfel O₄.
 $\frac{1}{2}$ -Aufspaltung von normalen und kleineren p_2 -Körnern

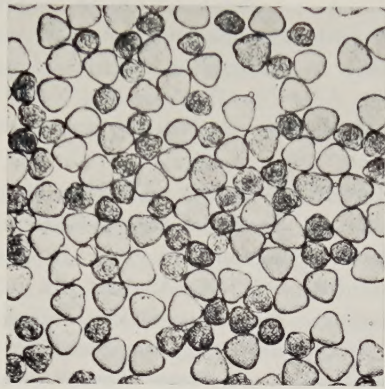


Abb. 4. Pollenbild von Apfel H₂₄₄.
 $\frac{1}{2}$ -Aufspaltung von normalen und kleineren p_2 -Körnern

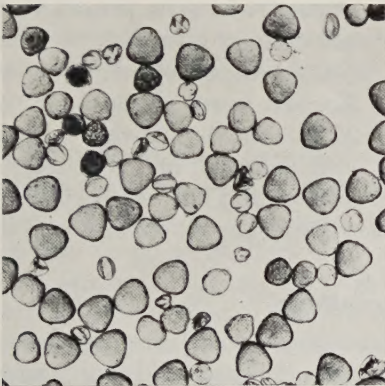


Abb. 5. Pollenbild von Apfel R₁.
 $\frac{1}{2}$ -Aufspaltung von normalen und verschieden regressierten p_3 -Körnern

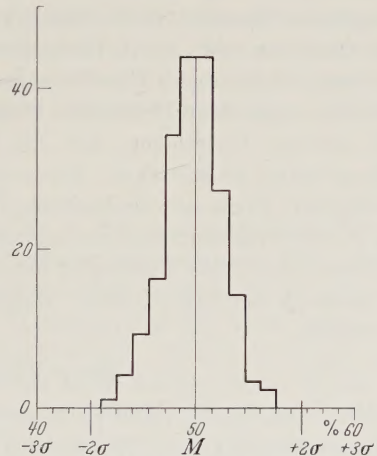


Abb. 6. Histogramm der Pollenwerte von 200 Auszählungen (225 Körner) aus Antheren der Birne O₂₇. Die Streuung liegt innerhalb der $\pm 2\sigma$ -Grenze

Ebenso interessant ist die Feststellung, daß der gleiche p -Faktor, — ob p_1 , p_2 oder p_3 —, sowohl beim Apfel wie bei der Birne aufgefunden werden kann; dies deutet immerhin auf ein gemeinsames Erbgut hin.

Der p -Faktor bei der Rebe

Es gelang uns, faktorielle Pollenletalität auch im Blütenstaub der Rebe aufzufinden. Seit 1954 wird jedes Jahr, im Weinbauinstitut Colmar, die Oberlinsche Rebenkollektion mit 369 Varietäten auf die Blüh- und Befruchtungsverhältnisse geprüft. Es zeigte sich, daß 23 Sorten dieser Kollektion mit Gewißheit 50%

schlechte Pollen abspalten; die bekanntesten seien genannt: *Terr-Gulmeck*, *Sémillon blanc*, *Gamet ordinaire*, *Affenthaler*, *Erzherzog Johann*, *Hansen*, *Blattraupe*, *Lachrima Christi*, *Chasselas Sainte Laure*. Im wesentlichen sind es hier Letalfaktoren, deren Wirkung dem p_1 - oder p_2 -Faktor des Apfels verglichen werden kann; es treten entweder vollkommen leere Körner auf, oder aber kleinere, nicht keimfähige. Selbstverständlich lenkte sich unsere Neugier auf die im Elsaß kultivierten Rebensorten. Aufs Geratewohl untersuchten wir den *Clos Saint-Landelin* in Westhalten, und fanden einen *Pinot musqué*, der zur Hälfte leere Hüllen, Jahr für Jahr, im Pollenbild zeigt. Es schien uns besonders angezeigt, den „*Chasselas*“ (= *Gutedel*) in dieser Hinsicht zu prüfen, denn dieses „Gewächs“ „verriest“ oft. Darum kämten wir ein ganzes Rebstück mit *Chasselas* durch. Auf die 215 Stöcke, die schließlich als ein einziger Klon betrachtet werden können, entfallen 13, die Pollensegregation aufweisen, indem 50% leerer Blütenstaub in der Anthere abgespalten wird. Ein Stock zeigt sogar vollkommen leeren Pollen; er fruchtet auch nie. Also ist die p -Mutation anscheinend nach der Pfropfung entstanden. Man könnte sogar einen Schritt weiter gehen und die Hypothese aufstellen, daß die Pfropfung auf die Unterlage gewissermaßen für die Mutation verantwortlich ist, besser gesagt, mutagen wirkt.

Dies reizte uns, im Weinbauinstitut Colmar, Experimentalparzellen zu untersuchen, von denen jede aus 25 Weinstöcken gleicher Unterlage und gleichen Pfropfreises besteht. Jede örtlich vorkommende Rebsorte, wie *Traminer*, *Riesling*, *Chasselas* usw., ist in 13 solcher Parzellen, jedesmal auf anderer Unterlage, angebaut. Schon beim Überblick der gesamten Anlage sieht man, je nach Unterlage, eine vegetative Differenz. Diese Erscheinung erblickt man auch im Pollenbild; gewisse Unterlagen, wie 125/1, 59 B, 6266, scheinen häufiger faktorielle Pollenletalität zu bewirken. Das auffallendste Resultat wurde bei dem auf 125/1 gepfropften *Traminer* beobachtet; unter den 25 Stöcken der Parzelle befinden sich 8, die Pollensegregation aufweisen (50% leere Körner), und 3 weitere, die Chimären sind: das Pollenbild der einen Rebgerte zeigt Pollensegregation, das der anderen nur gute Körner. Demnach scheint Pfropfung tatsächlich mutagen zu wirken.

Der p -Faktor bei *Oenothera*

Die Lage im Staubblatt der meisten heterogamen Nachtkerzen ist dadurch kompliziert, daß zwei Ursachen am Verkümmern des Pollens schuld sind. Die eine ist die Komplexletalität, die andere der p -Faktor, der der Komplexletalität epistatisch ist. Man beobachtet im Pollenbild 50% leere Körner, die mit p belastet sind; von den übrigen 50% wird nochmals die Hälfte durch den weiblichen Komplexfaktor inaktiviert, so daß z. B. bei *Oenothera syrticola*, *Oe. biennis* oder *Oe. suaveolens*, nur ein Viertel des Blütenstaubs befruchtungsfähig ist. *Oenothera Lamarckiana* dagegen zeigt nur zwei Pollenklassen: 50% volle und 50% leere Körner; Komplexletalität tritt nicht ein, denn *velans* und *gaudens* sind beide pollenaktiv; die leeren Körner sind durch p bedingt.

Allerdings kann man sich nicht auf einfachem Wege die Vererbung des p -Faktors bei *Oenothera* vorstellen; jedenfalls nicht durch den Pollen! Also durch die weibliche Gone. Dazu muß er vom Komplex unabhängig sein und auf dem paarenden Chromosomenende sitzen, denn er muß mendeln, um wieder in den Pollen zu gelangen. Schließlich möchten wir dann verstehen, weshalb auf diesem Wege nie ++-Pflanzen auftreten, die keine leeren Körner

aufweisen. Auch dies ist bei *Oenotheren* verständlich, denn die homozygote $++$ -Verbindung wird letal sein, genau wie z.B. die des Rotnervenfaktors R.

Bei *Oenothera fruticosa*, einer perennen tetraploiden Art, die meist 14 Bivalente in der Meiosis bildet, tritt der Letalfaktor in polysomischer Segregation auf. Dadurch ist die Pollenanalyse erschwert, denn das diploide Pollenkorn mit $++$, $+p$ -, oder pp -Genotyp, kann in Pflanzen gebildet werden, deren Genotyp $++++$ (*quadruplex*), $+++p$ (*triplex*), $++pp$ (*duplex*) oder $+ppp$ (*simplex*) ist. Wenn der Normalfaktor $+$ über den letalen p ganz dominiert, sind die erwarteten Proportionen guten Pollens folgende: 100% bei *quadruplex* und *triplex*, 83,3% bei *duplex*, und 50% bei *simplex*. Die beobachteten Werte gruppieren sich weitgehend um diese Möglichkeiten¹.

Überraschenderweise ändert sich das Pollenbild am Anfang und am Ende der Blütenzeit, hauptsächlich bei jungen Pflanzen, die erstjährig den ganzen Sommer hindurch blühen. Die Prozentwerte guten Pollens können dann große Streuung erfahren, z.B. von 0—50% bei *simplex*, oder von 20—80% bei *duplex*. Dies läßt sich dadurch erklären, daß die Gleichgewichtsbedingungen eines heterogenischen $+p$ -Pollenkorns nicht dieselben wie die eines homogenischen $++$ sind. Das normale $+$ -Allel dominiert effektiv nur, wenn die Pflanze in gutem physiologischem Zustande ist; in schlechter Kondition kann die Wirkung des letalen p -Allels nicht ganz unterdrückt werden, somit stirbt das heterogenische $+p$ -Korn genauso ab wie das homogenische pp . Das Pollenbild ist dann typisch: außer den ganz leeren Körnern beobachtet man regressierte, deren Entwicklung verschiedenzeitig nach der Pollenmitose gestoppt wurde. Es erscheint also nicht seltsam, daß die Prozentwerte guten Pollens so variabel sein können, je nach dem „Milieu“, in dem der Pollen geboren wird.

Diskussion

Die Pollenletalität gestattet einen Einblick in ein wichtiges Kapitel der Haplontengenetik bei Blütenpflanzen. Der p -Faktor ist ein rezessives Allel, dessen tödliche Wirkung im Erbgut des Gametophyten selbst vorhanden ist; er wird in reinem Zustand manifest, geht aber als Phänotyp zugleich auch zugrunde; p kann nur im heterozygoten Diplonten weiterbestehen. Eine homozygote pp -Verbindung kann nicht entstehen, es sei denn als Sonderfall doppelter Mutation.

Auf faktorielle Pollenletalität kann nicht ohne weiteres geschlossen werden, obwohl es zunächst höchst einfach erscheint, sie durch Körnerauszählung festzustellen. Pollenabort kann auch auf andere Ursachen zurückgehen wie Bastardierung, Polyploidie, Cytomixie oder ungünstige Außenfaktoren; letztgenannte setzen in manchen Blüten den Prozentwert guten Pollens bis unter 50% herab. Diesen verschiedenen Abortmöglichkeiten muß eventuell Rechenschaft getragen werden bei Beurteilung des Pollenbildes; sie können nur durch wiederholte Beobachtungen und ein geübtes Auge ausgeschlossen werden.

Der Pollenletalfaktor kennzeichnet einige Sorten des kultivierten Apfels und gewisse Arten der Gattung *Oenothera*. Die Individualität und die Permanenz eines bestimmten p -Allels bei diesen Pflanzen stellen ein eindrucksvolles Phänomen dar. Beim Apfel beruht die Erhaltung des p -Faktors auf der vegetativen

¹ Abgesehen von kleinen Abweichungen, die durch Chromatidensegregation hervorgerufen werden.

Vermehrung des Klons. Immerhin ist es bemerkenswert, daß ein heterogenisches Allelenpaar durch unendlich viele Mitosen und mehrere Überpfropfungen hindurch konstant immer wieder auftritt. Bei *Oenothera* wird die Pollenletalität durch permanente Heterozygotie, einem der Nachtkerze eigenen Mechanismus, beständig.

Durch das p -Allel wird eine ganze Pollenklasse eliminiert; somit erfolgt selektive Befruchtung, die aber nach Mendelschem Schema verläuft. Bei der Selbstung einer heterozygoten $+p$ -Pflanze werden weibliche $+$ - oder p -Gonen nur durch männliche $+$ -Gonen befruchtet; die Nachkommenschaft besteht zur Hälfte aus homozygoten $++$ -Pflanzen mit nur gutem Pollen, zur Hälfte aus heterozygoten $+p$ -Pflanzen, die Pollensegregation zeigen. Solches Resultat wird normalerweise bei Selbstung nie erwartet; zudem erhält man das gleiche, wenn eine $+p$ -Pflanze mit einem $++$ -Pollenspender gekreuzt oder sogar frei bestäubt wird. Das p -Allel vererbt sich matrokin.

Beim Ausfall der p -Gonen darf man nicht allein den Verlust des p -Allels betrachten, denn auch alle, mit p gekoppelten Gene gehen, je nach Koppelungsgrad mehr oder weniger, verloren. Dies kann eine beachtliche Abweichung der erwarteten Zahlenverhältnisse in der Aufspaltung der Diplontenphänotypen bewirken. Umgekehrt können aberrante Segregationsresultate als Störung durch faktorielle Gonenletalität angesehen werden und somit die Pollenletalität aufdecken lassen, wie z. B. bei *Matthiola*. Die Interferenz des p -Faktors wirkt sich in gleicher Weise aus, wie der Ausfall des S_1 -Pollens bei halb-inkompatibler $S_1S_2 \times S_1S_3$ Kreuzung von selbststerilen Pflanzen.

Das Auftreten des p -Allels in der Rebe nimmt eine Sonderstellung ein, weil sie allem Anschein nach, leicht nach p mutiert. Die p -Mutation kann in der Blüte ohne Schwierigkeit und sofort nach ihrem Auftreten festgestellt werden, was für andere rezessive Mutationen, die im Sporophyten passieren, nicht der Fall ist. Hier müssen zuerst zwei gleiche Allele homozygot kombiniert werden, um die Eigenschaft phänotypisch erscheinen zu lassen. Man hat den Eindruck, daß gewisse Rebensortimente in einer Umwelt häufiger als in der anderen mutieren. Das sog. „Altern des Klons“ kann vielleicht als Ansammeln rezessiver Mutationen aufgefaßt werden. p könnte als ein Indikator hierfür gelten. Wo p im Klon auftritt, ist „Degeneration“ im Gange. p erweist sich als bester Test, um die Mutationsfrequenz im Klon leicht festzustellen. Deshalb sollte das Pollenbild als ein wichtiges Kriterium bei der Zuchtwahl neuer Rebensortimente berücksichtigt werden.

Das Interesse an der Blütenpflanzengenetik beschränkt sich nicht auf den des Sporophyten. Die Untersuchung der Pollenletalität erlaubt es, auch die kurze Haplophase der Blütenpflanzen genetisch zu studieren und damit einen Anschluß an die Genetik der Haplonten herzustellen.

Literatur

- BELLING, J.: A unique result in certain species crosses. Z. indukt. Abstamm.- u. Vererb.-Lehre **39**, 286—288 (1925).
- BUCHHOLTZ, J. T., and A. F. BLAKESLEE: Genes from radium treatment affecting pollen tube growth in *Datura*. Genetics **21**, 731—751 (1936).
- BURNHAM, C. R.: Cytogenetic studies of a case of pollen abortion in maize. Genetics **26**, 460—468 (1941).

- EMERSON, S.: Linkage relationship of 2 gametophytic characters in *Oenothera organensis*. *Genetics* **26**, 469—473 (1941).
- GAGNIEU, A.: Héritéité polysomique: travaux récents, points de vue actuels sur l'étude des Polyploïdes. *Année biol.* **24**, 321—350 (1948).
- La stérilité pollinique: son déterminisme génétique. *Année biol.* **27**, 5—20. *Bibliographie* (1951).
- Production de pollen chez le pommier: possibilité de léthalité génique monofactorielle. *Ann. Amél. Plantes* **4**, 42 (1951).
- Etude d'une collection de variétés de pommiers cultivées en France. Comportement caryologique et caractères du pollen. *Ann. Amél. Plantes* **2**, 237—245 (1955).
- LINDER, R.: Etude des conditions de fécondation dans les populations naturelles de pommiers et de poiriers de la région de la Hart. I. Observation de léthalité pollinique en ségrégation monofactorielle. *Bull. Soc. bot. France* **100**, 4—6, 144—145 (1953).
- Etude génétique de mécanismes qui limitent la fertilité dans *Oenothera missouriensis* et *Oenothera fruticosa*. *Année biol.* **30**, 501—518 (1954).
- LINDER, R., R. JEAN et M. BOUTANTIN: Etude des oenothères en Alsace. *Bull. Soc. Hist. Nat. Colmar* **48**, 21—49 (1958).
- MANGELSDORF, P. C., and D. F. JONES: The expression of mendelian factors in the gametophyte of maize. *Genetics* **11**, 423—455 (1926).
- MÜNTZING, A.: Disturbed segregation ratio in *Galeopsis* caused by intraspecific sterility. *Hereditas* (Lund) **16**, 73—103 (1932); **32** (1946).
- OEHLKERS, F.: Entwicklungsgeschichte der Pollensterilität einiger Oenotheren. *Z. indukt. Abstamm.- u. Vererb.-Lehre* **43**, 265—284 (1927).
- RENNER, O.: Versuche über die gametische Konstitution der Oenotheren. *Z. indukt. Abstamm.- u. Vererb.-Lehre* **18**, 121—294 (1917).
- Über Sichtbarwerden der Mendelschen Spaltung im Pollen von Oenotherenbastarden. *Ber. dtsh. bot. Ges.* **37**, 129—135 (1919).
- Zur Biologie und Morphologie der männlichen Haplonten einiger Oenotheren. *Z. Bot.* **11**, 305—380 (1919).
- SNOW, R.: Counted grain pollinations in *Matthiola*. *Amer. Naturalist* **58**, 316—321 (1924).
- Germination tests with pollen of stocks. *J. Genet.* **15**, 237—243 (1925).
- WADDINGTON, C. H.: Pollen germination in stocks and the possibility of applying a lethal factor hypothesis to the interpretation of their breeding. *J. Genet.* **21**, 193—206 (1929).

Dr. R. LINDER, Institut de Botanique, Strasbourg u. Lille

Aus dem Botanischen Institut der Universität zu Köln

ENTWICKLUNGSPHYSIOLOGISCHE UND GENETISCHE UNTERSUCHUNGEN
ÜBER DIE DIFFERENZIERUNG DER FORTPFLANZUNGSORGANE
AN *ALLOMYCES ARBUSCULA* BUTL.*

Von

P. FÄHNRICH

Mit 9 Textabbildungen

(Eingegangen am 14. Dezember 1960)

I. Einleitung

Der Phycomycet *Allomyces arbuscula* ist auf Grund seines antithetischen Generationswechsels zwischen isomorphem Sporophyt und Gametophyt ein geeignetes Objekt, Aufschlüsse über die physiologischen Vorgänge bei der Determination und Organdifferenzierung zu geben.

Der Entwicklungszyklus von *Allomyces arbuscula* verläuft folgendermaßen: Die Zygote entwickelt sich ohne Ruheperiode zum diploiden Sporophyten mit 2 Typen von Fortpflanzungsorganen: Meiosporangien (Dauersporangien) und Mitosporangien (Zoosporangien). Die diploiden Mitosporen wachsen zu neuen sporophytischen Mycelien aus. In den Meiosporangien vollzieht sich nach einer Reifeperiode die Meiose (KNIEP 1930, EMERSON und WILSON 1949, WILSON 1952). Die haploiden Meiosporen (Planosporen) wachsen zu monözischen Gametophyten heran, deren Hyphen die Makro- und die carotinhaltigen Mikrogametangien paarweise angeordnet tragen. Die farblosen Gynogameten verschmelzen mit den kleineren, pigmentierten Androgameten zu Zygoten. Eine Abweichung vom normalen Gametophyten weist der haploide „*Mischgametophyt*“ (MX) auf: Neben Gametangien bildet diese Pflanze Dauersporangien aus (SÖRGEL 1937, EMERSON 1941, HATCH 1944). In diesen entstehen nach Mitosen haploide Zoosporen, die sich wieder zu Mischgametophyten entwickeln (STUMM 1958).

Im normalen Entwicklungsangang des Pilzes sind die Gametangien streng an die haploide Phase gebunden. Die diploide Pflanze bildet nur Sporangien aus. Colchicin-diploide Gametophyten legen keine sporophytischen Fortpflanzungsorgane an (SOST 1955). Bedingungen im Plasma entscheiden demnach darüber, ob sich eine Pflanze zum Sporophyten oder zum Gametophyten differenziert.

Der erste Teil dieser Arbeit beschäftigt sich mit der Fragestellung, wie weit durch Zellgifte die Differenzierungsvorgänge umzustimmen sind. Die Versuche zeigten, daß die zur Differenzierung führenden physiologischen Reaktionen mit den angewendeten Methoden nicht zu beeinflussen waren. Im Verlauf der Untersuchungen traten abnorme Pflanzen auf, deren genetische Analyse einen begrenzten Einblick in die Determinations- und Differenzierungsprozesse gestattete. Dies soll in Abschnitt IV und V dieser Veröffentlichung dargestellt werden.

II. Material, Kultur- und Kreuzungstechnik

1. Material

Der zu den vorliegenden Untersuchungen benutzte Stamm von *Allomyces arbuscula* wurde vom CBS in Baarn, Holland, bezogen. Eine sporophytische und eine gametophytische Einsporkolonie dienten als Ausgangspflanzen.

* Dissertation der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Universität Köln.

2. Nährmedien und Kulturmethoden

a) **Maximalmedien.** Laevulose-Pepton-Agar (LP-Agar; Standardsubstrat): 2,5 g d-Laevulose, 2,5 g Pepton und 15 g Agar auf 1000 cm³ dest. Wasser (STUMM 1958).

YpSs-Agar nach EMERSON (EMERSON 1941).

b) **Minimalmedium.** Medium A nach INGRAHAM und EMERSON (INGRAHAM und EMERSON 1954, abgeändert): Auf 1000 cm³ dest. Wasser 5 g d-Laevulose, 1 g Glutaminsäure, 0,1 g Methionin, 0,5 g K₂HPO₄, 0,25 g MgSO₄ · 7H₂O, 1 g (NH₄)₂SO₄, 200 γ Thiamin. Für feste Nährböden zusätzlich 20 g Agar. Die Laevulose wurde getrennt von der Restlösung sterilisiert, der pH-Wert mit KOH auf 6,6 eingestellt.

Die Erhaltungskulturen wurden auf LP-Agar bei 25° aufbewahrt. Die Temperatur betrug bei den meisten Experimenten 32°.

3. Technik der Kreuzungen

Die Gametangien wurden von LP-Platten mit einer Lanzettzettel abgenommen und auf einem Objektträger in sterilem Wasser suspendiert. Mit Kapillarpipetten wurden voneinander getrennte Gametangien auf weitere Objektträger so verteilt, daß die Wassertropfen nur Mikro- bzw. Makrogametangien enthielten. Die beiden Gametangientypen ließen sich unter dem Präpariermikroskop eindeutig unterscheiden. Zur Kreuzung wurden die Gametangien (je nach Keimfähigkeit 2—6 von jedem Elter) auf 0,8%igen LP-Agar pipettiert, mit einer Nadel aneinandergelegt und mit einem Wassertropfen bedeckt. Bei Raumtemperatur kopulierten die Gameten nach 60 min.

III. Versuche zur Umdetermination des Gameto- bzw. Sporophyten

Bei dem Phycomyceten *Blastocladiella emersonii* ist als ein morphogenetisch wirksames Prinzip das Ketoglutarat-Oxydase-System im Tricarbonsäurezyklus erkannt worden (CANTINO 1953, CANTINO 1956). Für *A. arbuscula* sind stoffwechselphysiologische Prozesse, welche die Differenzierung der vier verschiedenen, die beiden Generationen charakterisierenden Fortpflanzungskörper einleiten, bisher unbekannt. Dagegen finden sich mikroskopisch und cytochemisch nachweisbare Plasmaunterschiede in den einzelnen Organanlagen:

In den Mitosporangien sind weder im Initialstadium noch in späteren Stadien Mitochondrien, dafür aber zahlreiche Lipoidgranula nachweisbar. Um die Kerne lagern sich Kernkappen, die mit sauren Farbstoffen gleichfalls keinen Mitochondriennachweis ergeben (RITCHIE 1947). In unreifen Meiosporangien erscheinen in großer Zahl Chromosphären von 3—4 μ Durchmesser. Sie bestehen aus Ribonucleoprotein und zerfallen vor der Meiose (ROREM und MACHLIS 1957). In den Gametangien fand HATCH (1935) eine ungleiche Verteilung der Mitochondrien. Sie waren in den Makrogametangien angereichert. Dieser Befund ist bedeutsam unter dem Gesichtspunkt, daß die Mitochondrien Träger von Fermenten des Tricarbonsäurezyklus sind. TURIAN (1957) konnte in den Hyphenspitzen des Gametophyten einen Ribonucleoproteingradienten nachweisen, der im Bereich des prospektiven Gametangiums am größten ist.

Die Verwendung von Zellgiften schien zunächst aussichtsreich, um Anhaltspunkte für die physiologischen Vorgänge der Organdifferenzierung zu gewinnen. Aus der Vielzahl von organischen und anorganischen Verbindungen mit bekannten Hemmeffekten wurden einige ausgewählt: 2,4-Dinitrophenol, Jodessigsäure, Fluoressigsäure, Natriumarsenat, Natriumfluorid (zusammenfassende Darstellung ihrer Wirkungsweise s. EBERHARDT 1952), Natriumazid und die Acridinderivate Acridinorange und Trypaflavin.

Die Inhibitoren wurden dem Minimalmedium zugefügt. Für die Versuche wurden Agarplatten mit jungen undifferenzierten Mycelien oder mit Sporen beimpft.

1. Versuche mit haploiden Gametophyten und diploiden Sporophyten

2,4-Dinitrophenol, ein Hemmstoff für ATP-abhängige Synthesen, hemmte das Wachstum stark, ließ aber die Differenzierungsvorgänge am Sporophyten unberührt. Auf 2,4-DNP-haltigem Substrat gereifte Dauersporangien entließen Meiosporen, die zu Gametophyten auswuchsen (Konzentration an 2,4-DNP: $1,25 \cdot 10^{-5}$ mol/l).

Jodessigsäure, die mit den Sulfhydrylgruppen von SH-Fermenten (Dehydrasen) reagiert, hatte keinen Einfluß auf die Organdifferenzierung von Sporophyten und Gametophyten (Konzentrationen: $2,5 \cdot 10^{-6}$ mol/l und $5 \cdot 10^{-5}$ mol/l). Bei der höheren Konzentration verschob sich am Sporophyten das Verhältnis von Meiosporangien zu Mitosporangien zugunsten der letzteren.

Fluoressigsäure, eine Blocksubstanz für die Oxydation von Brenztraubensäure und den Acetatabbau, änderte gleichfalls nicht die Generationsart (Konzentrationen: $2,5 \cdot 10^{-5}$ mol/l und $5 \cdot 10^{-5}$ mol/l).

Natriumarsenat kann Phosphat ersetzen; die Synthese von ATP unterbleibt bei gleichzeitigem Substratabbau. Sporophytisch determiniertes Mycel blieb unter dem Einfluß von Arsenat unverändert. Die in Arsenatlösungen ($1 \cdot 10^{-4}$ mol/l) gebildeten Meiosporen wuchsen zu Gametophyten heran.

Acridinorange. Acridinorange lagert sich bevorzugt an RNS-haltige Strukturen des Cytoplasmas an (BETZ 1953, SCHÜMMELFEDER, EBSCHNER und KROGH 1957). Daher ist es zu verstehen, daß die Eiweißsynthese und proteinabhängige Reaktionen in der Zelle gestört werden können (KÖLBEL 1947, STEIN 1953). BOGEN und KESER (1954) fanden an Hefezellen einen bevorzugten Abbau methioninhaltiger Eiweißfraktionen durch Acridinorange.

Die Farblösung wurde dem Minimalagar zugesetzt (Konzentrationen: 1:10000 und 1:30000, p_H 5,8). Zoosporen und Zygotenkeimlinge dienten als Impfmateriel (je 40 Pflanzen pro Konzentrationsstufe).

Alle Keimlinge, die erst wenige Stunden alt waren und nur einen kurzen Keimschlauch ausgebildet hatten, starben auf dem Farbagar ab. Ältere Pflänzchen mit mehreren dichotom verzweigten Hyphen wuchsen zu Sporophyten mit Mito- und Meiosporangien aus. Die Dauersporangien blieben steril.

Trypaflavin (3,6-diamino-methylacridiniumchlorid). Trypaflavin-Agarplatten wurden wie im vorigen Versuch mit organlosen Einsporfpflanzen beimpft (Konzentrationen: 1:10000, 1:100000 und 1:1000000, p_H 5,6).

Auf Trypaflavin-Agar 1:10000 entwickelten sich nur ältere Keimpflanzen. Die in den Konzentrationen von 1:10000 und 1:100000 ausgebildeten Meiosporangien waren steril. Dagegen entließen die Dauersporangien solcher Sporophyten, die 6 Wochen auf Trypaflavin 1:100000 kultiviert wurden, lebensfähige Meiosporen, die sich zu normalen Gametophyten ausdifferenzierten. Regenerate von sporophytischen Mycelien, die 3 Wochen auf Trypaflavin-Platten 1:10000 gewachsen waren, bildeten auf Standardagar Sporophyten mit normal funktionsfähigen Meiosporangien aus.

2. Versuche mit einem diploiden Gametophyten

Die Versuche zur Umstimmung einer Generationsart wurden auf einen diploiden Gametophyten ausgedehnt. Versuche zu dessen Umdeterminierung sollten eher Erfolg versprechen, da hier das Genom des Sporophyten vorhanden ist (v. WETTSTEIN 1942). Der verwendete Gametophyt entstand nach einer C-Meiose aus einer einzelnen Meiospore (0,1%ige Colchicininlösung). Das Mycel zeichnete sich durch verlangsamtes Wachstum und Vermännlichung aus.

Zu den Versuchen kamen Hyphenspitzen auf Agarplatten (p_H 6), die folgende Gifte enthielten: Acridinorange (1:10000), Trypaflavin (1:30000), Natriumarsenat ($3 \cdot 10^{-6}$ mol/l), Natriumfluorid ($3 \cdot 10^{-3}$ mol/l, zur Hemmung der Aktivität Mg-haltiger Enzyme) und Natriumazid ($3 \cdot 10^{-6}$ mol/l, als Entkoppler der oxydativen Phosphorylierung). Die Pflanzen verblieben 3 Wochen unter diesen Versuchsbedingungen. Alle Kolonien verhielten sich, abgesehen von Wachstumsstörungen, wie die Kontrollen.

Zusammenfassend läßt sich zu diesen Versuchen sagen, daß gezielte Störungen des Stoffwechsels die Determination von Reproduktionsorganen nicht änderten. An Mycelien beider Generationsarten konnten die vorbestimmten Differenzierungsvorgänge mit der angewendeten Methode nicht umgestimmt werden. Selbst an diploiden Gametophyten ließen sich keine Vorgänge einleiten, die zur Ausbildung sporophytischer Fortpflanzungsorgane hätten führen können.

IV. Untersuchungen an abnormen Gametophyten

1. Morphologie und genetisches Verhalten der Stämme

Der sporophytische Ausgangsstamm wies nach einjähriger vegetativer Kultur einen Sektor mit Gametangienpaaren und einzeln stehenden Mikrogametangien auf. Von diesem Sektor wurde eine Einhyphenkultur W1 angelegt, welche die morphologischen Eigenschaften konstant beibehielt. Die mittleren Kernvolumina des Wildgametophyten und des W1-Mycels verhielten sich zueinander wie 1:1,50, die von W1 zum Wildsporophyten wie 1:1,32.

Die Kernvolumina wurden nach der Formel $V = \frac{4}{3} \pi r^3$ berechnet. Die Bestimmung der absoluten Kerndurchmesser erfolgte mit dem Schraubenmikrometer „OKNOR“ von Leitz.

Tabelle 1. Geschlechtsverschiebung, Gametangienvolumina und Kernvolumina verschiedener Gametophyten von *A. arbuscula*

W-22m(1) ist eine F_1 -Pflanze aus der Selbstung von W-22m.

Stamm	Gametangien gepaart			Gametangien einzeln		Geschlechtsausprägung		Gametangienvolumen $\frac{4}{3} \pi r^3 (\mu^3)$		Kernvolumen $\frac{4}{3} \pi r^3 (\mu^3)$
	♀-♂	♀-♀	♂-♂	♀	♂	♀ %	♂ %	♀	♂	
nG	735	1	0	41	2	51	49	$2,6 \cdot 10^4$		20,6
W-18w	20	62	0	474	9	95	5	$5,6 \cdot 10^4$		29,0
W-22m	12	5	42	31	708	6	94		$12,5 \cdot 10^4$	39,4
W-22m(1)	4	1	9	50	502	10	90			

Nach Selbstung wurden von W1-Sporophyten 560 F_1 -Pflanzen aufgezogen. Von diesen erwiesen sich nur 18 als Wildgametophyten, 542 Kolonien glichen dem Elter W1 im vegetativen Wachstum. Unter diesen wichen 2 Mycelien, W-18w und W-22m, hinsichtlich der Gametangien deutlich von W1 ab.

Der Gametophyt W-18w zeigte sich stark weiblicht, W-22m war vermännlicht. Beide Gametophyten besaßen auffallend große Fortpflanzungskörper (Abb. 2 und 3; Tabelle 1).

Die Stämme W-18w und W-22m wurden geselbstet. Aus den entsprechenden Sporophyten gingen Meiosporen hervor, die zu Gametophyten auskeimten, welche den Phänotypus der Elterpflanzen aufwiesen; die Wildform fehlte. Die F_1 -Gametophyten aus Rückkreuzungen von W-18w mit dem Wildtyp ließen keinen Reziprokenunterschied erkennen. Gametophyten vom Typ W-18w traten unter 931 Kolonien nur noch 12mal auf (Tabelle 2). Viele junge Keimpflanzen starben ab.

Tabelle 2. Verteilung der F_1 -Pflanzen aus reziproken Kreuzungen des Gametophyten W-18w mit dem Wildgametophyten nG

Kreuzung	Zahl der Gametophyten	W-18w	nG	Gametophyten mit großen Gametangienpaaren	Vermännlichte Gametophyten
W-18w × nG	327	4	317	5	1
nG × W-18w	604	8	595	1	0

Aus der Kreuzung nG \times W-22m gingen 10 Sporophyten hervor, doch nur bei einer Pflanze lief in den tiefbraunen, großen Dauersporangien die Meiose ab. In der gametophytischen F₁-Generation traten die Merkmale in einem Zahlenverhältnis auf, das nicht auf einer Mendelspaltung beruhen konnte. Unter



Abb. 1

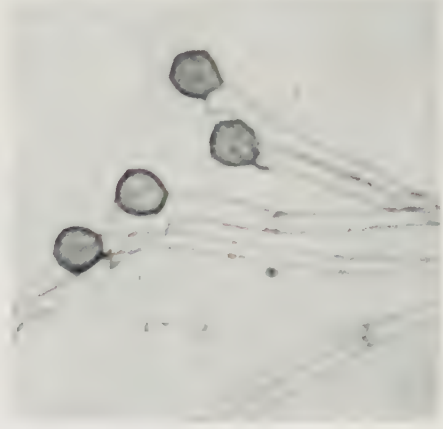


Abb. 2

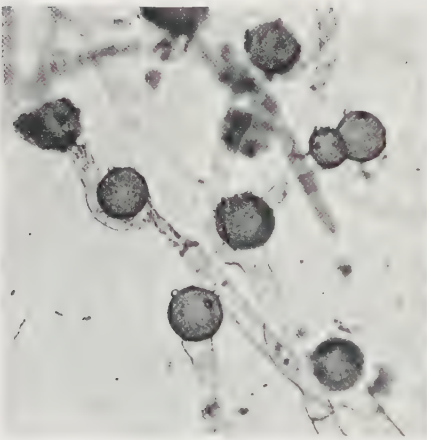


Abb. 3

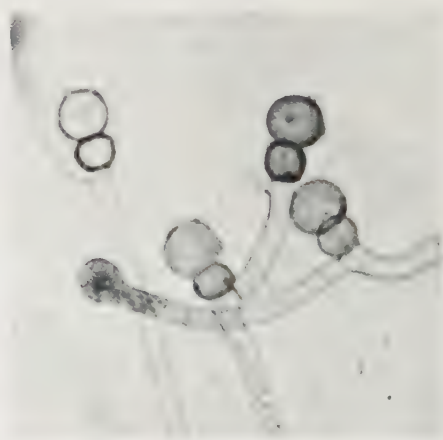


Abb. 4

Abb. 1. Normaler Gametophyt. Vergr. 120:1

Abb. 2. Verweiblichter Gametophyt W-18w. Vergr. 120:1

Abb. 3. Vermännlichter Gametophyt W-22m. Das Gametangienpaar besteht aus 2 Mikrogametangien. Vergr. 120:1

Abb. 4. F₁-Gametophyt aus der Kreuzung nG \times W-22m. Die Gametangien sind paarweise angeordnet, aber größer als die Gametangien der Wildform. Vergr. 120:1

235 Pflanzen befanden sich 35 reine Wildformen, 200 Gametophyten hatten häufig neben einzeln angeordneten Fortpflanzungskörpern auch Gametangienpaare ausgebildet, deren Größe die der Wildform stark übertraf (Abb. 1 und 4). Nur 3 Pflanzen besaßen den Phänotyp des Elter W-22m. Die Kreuzung W-22m \times nG blieb erfolglos.

2. Folgerungen aus den Versuchsergebnissen

Die Gametophyten W-18w und W-22m fallen hauptsächlich dadurch auf, daß das normalerweise ausbalancierte Geschlechtsverhältnis zugunsten der weiblichen bzw. männlichen Seite verschoben ist. Die Kerngrößen lassen in ihnen Genommutanten mit heteroploiden Chromosomensätzen vermuten (Abb. 5). Die Ergebnisse der Kreuzungen sprechen gleichfalls für aneuploide Kerne in beiden Formen. Das gestörte Chromosomengleichgewicht würde sich dann in dem Sinne in den neuen Phänotypen ausprägen, daß je nach Art und Zahl der überzähligen Chromosomen eine quantitative Verschiebung von Realisatoren zustande kommt und die weibliche bzw. männliche Tendenz im Gametophyten von *A. arbuscula* jeweils einseitig gefördert wird.

EMERSON und WILSON (1954) berichten von ähnlichen Befunden bei F_1 -Gametophyten von interspezifischen Hybriden (*A. arbuscula* $n = 16 \times$ *A. macrogynus* $n = 28$). Sie fanden neben intermediären Formen solche, deren Gametangien über 90% männlich oder weiblich differenziert waren. Dies konnten sie nach cytologischen Untersuchungen so deuten, daß ungepaarte Chromosomen in der Meiose der Hybriden zufallsgemäß auf die Gonen verteilt wurden. Es entstanden Meiosporen, die auf Grund ihrer chromosomalen Verhältnisse sich zu ausgeprägt männlichen oder weiblichen Pflanzen entwickelten.

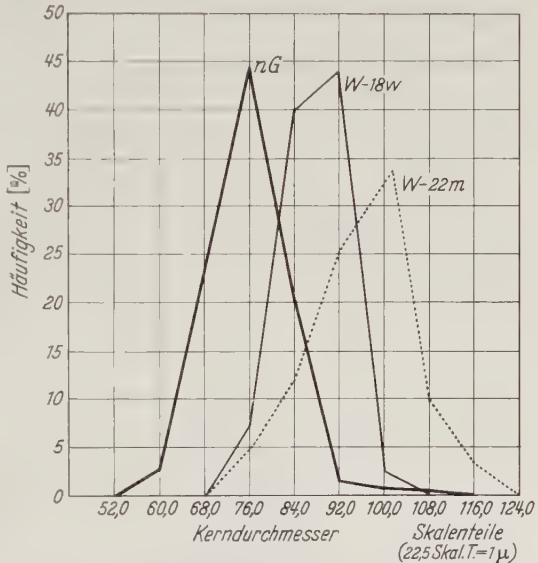


Abb. 5. Kerndurchmesser der Gametophyten W-22m, W-18w und des Wildgametophyten nG. — nG ($n = 206$); — W-18w ($n = 100$); W-22m ($n = 259$)

V. Untersuchungen an einem Stamm mit verminderter Carotinsynthese

1. Herkunft und Beschreibung des Stammes CM

Der Wildgametophyt bildete nach 18monatiger Kultur unter normalen Bedingungen einen schmalen, makroskopisch farblosen Sektor aus. Die Mikrogametangien wiesen bei mikroskopischer Beobachtung nur eine ganz schwache Gelbfärbung des Plasmas auf. Dieses mit CM (Carotinmangel) bezeichnete haploide Mycel wurde vegetativ auf LP-Substrat vermehrt. Seine typischen Eigenschaften — mangelnde Pigmentierung, verringerte Wachstumsgeschwindigkeit und Luftmycelien — behielt der Stamm über alle Passagen auf LP- und Minimalmedium bei.

2. Analyse der Carotine des CM-Stammes

a) **Methode.** Die Anzucht der Mycelien erfolgte in Petrischalen auf 1,2%igen LP-Agar, dessen Oberfläche eine sterile Cellophanschibe bedeckte. Dadurch war eine Verunreinigung der gametophytischen Kulturen mit sekundär gebildeten Sporophyten als Folge von Gametenkopulationen gut auszuschließen. Die Mycelien ließen sich mit einem Spatel unbeschädigt und frei von Substrat abheben. Sie wurden sofort der Hochvakuum-Gefriertrocknung unterzogen (Gefriertrocknungsanlage G 01, LEYBOLD). Für jede Analyse betrug die Einwaage etwa 180 mg Trockenmaterial (annähernd 130 Mycelien). Das homogenisierte Material wurde

mit Aceton extrahiert und der Gesamtextrakt im Vakuum unter N_2 -Atmosphäre eingengt. Zur Verseifung stand der Extrakt, mit K_2CO_3 -Lösung versetzt, unter N_2 -Druck 16 Std. bei Raumtemperatur im Dunkeln (GOODWIN 1955). Danach wurden die Carotine in Petroleumbenzin übergeführt, aceton- und alkalifrei gewaschen und auf 2 ml eingengt. Die chromatographische Trennung der Pigmente erfolgte an Na_2SO_4/Al_2O_3 -Säulen (Al_2O_3 nach BROCKMANN). Zur Entwicklung der Chromatogramme diente Petroleumbenzin mit 4% Aceton.

Für die quantitative Bestimmung der Carotine unterblieb die Trennung an der Al_2O_3 -Säule; nach Trocknen über Na_2SO_4 wurde der klare Extrakt spektralphotometrisch ausgewertet (Spektralphotometer Zeiss).

b) Ergebnisse. Verschiedene Autoren haben die Carotinspektren von *A. arbusecula* und *A. javanicus* untersucht (EMERSON und FOX 1940; TURIAN und HAXO 1954; FOLEY 1958). Lycopin, β -Carotin und γ -Carotin geben den männlichen

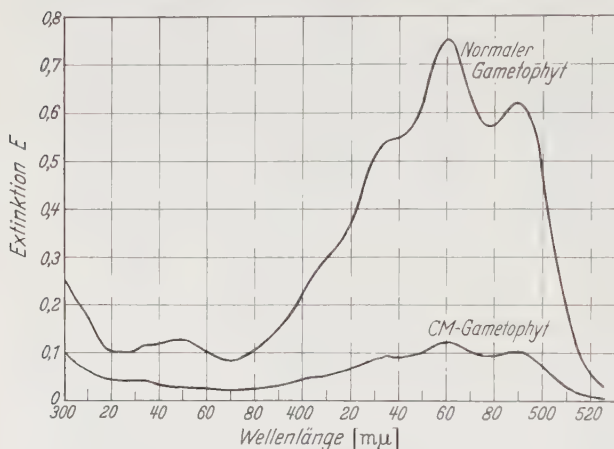


Abb. 6. Absorptionsspektren der Carotine des Wildgametophyten und des CM-Gametophyten

Die quantitative Analyse der Pigmente zeigte erwartungsgemäß einen eindeutigen Unterschied im Carotingehalt der beiden Stämme. Der Wildgametophyt synthetisierte im Vergleich zum CM-Gametophyten etwa die 5fache Carotinmenge (Abb. 6).

3. Versuche zur Anregung einer normalen Carotinsynthese im CM-Gametophyten

Es wurde auf mehreren Wegen angestrebt, den CM-Gametophyten anzuregen, die Pigmente entweder in normaler Konzentration oder wenigstens vermehrt zu bilden. Kalt sterilisierte (Seitz-Filter) wäßrige Extrakte von Wildgametophyten, dem CM-Stamm im Substrat geboten, führten zu keinem Erfolg. Wildgametophyten, gemeinsam mit CM-Kolonien auf Agar kultiviert, konnten ebenfalls keine erhöhte Pigmentbildung induzieren. Eine dritte Methode, die das gleiche Ziel verfolgte, nutzte die Tatsache aus, daß Hyphenstücke, insbesondere Hyphenspitzen, zu neuen Pflanzen regenerieren. Bringt man solche Hyphenfragmente mit Plasma eines anderen Stammes in Kontakt, so könnte sich für diese die Möglichkeit geben, aus dem sie umgebenden Medium Stoffe oder auch Partikel aufzunehmen. Der entsprechende Versuch soll im folgenden näher beschrieben werden.

a) Methode. In 100 ml-Erlenmeyerkölbchen mit 30 ml YpSS-Medium wurden Mycelien der Stämme W-22m oder CM bis zur Ausdifferenzierung von Gametangien bei 25° bebrütet. Die gut entwickelten und noch wachstumsfähigen Kolonien wurden von der Nährlösung getrennt. Der Stamm W-22m (s. S. 11) wurde als Plasmadonator verwendet, weil sein Mycel auf Grund seiner vom Wildtyp abweichenden, konstanten morphologischen Eigenschaften dazu geeignet war. Normales gametophytisches Mycel hätte ein positives Ergebnis des Ver-

Fortpflanzungsorganen bzw. Gameten ihre Ausfärbung. An unserem normalen Gametophyten konnten gleichfalls im Chromatogramm die für Lycopin, β -Carotin und γ -Carotin charakteristischen Banden nachgewiesen werden. In den Extrakten des CM-Gametophyten waren ebenfalls die 3 Carotine vorhanden, den Hauptanteil machte auch hier das γ -Carotin aus. Eine Anhäufung von Carotinvorstufen wurde nicht bemerkt.

suches vortäuschen können, da der eventuell zur gesteigerten Carotinsynthese induzierte CM-Stamm nicht von der Wildform unterschieden werden kann. Das Mycel des Stammes W-22 m wurde in eiskühler 0,4%iger LP-Lösung im Waring Blendor zerkleinert. Darauf wurde das CM-Mycel zugefügt und beides im Blendor fragmentiert. 10 ml-Anteile des Homogenisats gelangten in 100 ml-Erlenmeyerkölbchen zur weiteren Kultur bei 32°. Aus diesen wurden nach 14 Std je 2 ml auf LP-Agar plattiert.

b) Ergebnisse. Die Hyphenregenerate waren nach 8 Tagen zu eindeutig bestimmbaren Kolonien herangewachsen. Unter den Kolonien fand sich nie ein Mycel, das dem Wildgametophyten glich (Tabelle 3). Das Ausbleiben einer im Sinne der Versuchsanstellung positiven Reaktion

konnte verschiedene Ursachen haben: 1. Systeme, welche die Carotinbildung fördern oder auch hemmen, gelangten nicht in den wäßrigen, zellfreien Extrakt oder konnten als Bestandteile der wäßrigen Lösung und des Plasmahomogenisats die Grenzflächen des Cytoplasmas nicht passieren; 2. sie waren extracellulär nicht beständig.

Tabelle 3. *Kolonietypen nach Aufzucht von gametophytischen Regeneraten in einem Gemisch zweier verschiedener gametophytischer Plasmahomogenisate*

	Alter der Kolonien Tage	Gesamtzahl der Kolonien	Kolonietypen		
			CM	W-22 m	Normaler Gametophyt
Versuch 1	8	51	30	21	0
Versuch 2	8	837	288	549	0

4. Die Genetik des CM-Stammes

a) Selbstungsversuche. Gametophytische CM-Mycelien mit reifen Reproduktionsorganen wurden auf der Agarplatte mit sterilem Wasser übergossen. Die Gametangien der CM-Kolonien entließen nur schwach bewegliche Gameten, die Gameten gleichaltriger Wildgametophyten schwärmten dagegen lebhaft.

Die CM-Sporophyten unterschieden sich eindeutig von normalen Sporophyten. Die Zygoten entwickelten sich langsam. Die jungen Keimpflanzen bildeten wurmförmige oder auch gedrehte Keimschläuche, die seitlich auswuchsen, während der diploide Keimling des Wildtyps eine Mycelscheibe anzulegen begann. Die Dauersporangien blieben bei CM hauptsächlich auf den zentralen Mycelbereich beschränkt. Nach einer Kulturdauer von 6–10 Tagen machten sich in hohem Maße Degenerationserscheinungen in den CM-Meiosporangien bemerkbar: Im Sporangieninhalt traten Vakuolen und Fettkörper auf und das Plasma zerfiel schließlich. Unter den normalen Auslösebedingungen wurde versucht, die Meiosporangien in den verschiedensten Altersstadien zur Keimung zu bringen. Sie blieb in häufig angestellten Versuchen stets aus.

b) Kreuzungsversuche. Die aus der Kreuzung $CM \times nG$ hervorgegangenen Sporophyten zeigten den für Wildsporophyten typischen Mycelcharakter. Wüchsigkeit und Ausbildung von Dauersporangien waren normal, die Dauersporangien entließen bewegliche Meiosporen. Unter 2140 aufgezogenen haploiden Einsporokulturen aus 7 Kreuzungen trat der CM-Gametophyt in der F_1 -Generation nicht mehr auf. Die Sporophyten aus insgesamt 40 Kreuzungen $nG \times CM$ wiesen dagegen einheitlich den Myceltyp auf, der den CM-Selbstungssporophyten kennzeichnet. In dieser Kreuzung bestimmte also der CM-Mikrogamet die abnorme Ausprägung des Bastards. Von 30 Kreuzungen wurden jeweils mehrere Bastardsporophyten ($nG \times CM$) auf die Fertilität ihrer Dauersporangien getestet. Die Meiosporangien der ($nG \times CM$)-Hybridpflanzen blieben im Gegensatz zu den gleichaltrigen

Kontrollen steril. An ihrem Plasma ließen sich schon nach 4 Tagen die auch am Selbstungs-sporophyten von CM erkennbaren Degenerationserscheinungen feststellen.

Nur ein Sporophyt entließ wenig bewegliche Mitosporen, die sich zu neuen Sporophyten (183) entwickelten. Sie behielten alle abnormen Eigenschaften bei; der Inhalt ihrer Dauersporangien war ebenfalls schon vor Ablauf der normalen Reifeperiode zerfallen.

Die Kreuzungsversuche hatten einen eindeutigen Reziprokenunterschied zum Ergebnis: $nG \times CM$ ergibt einen sterilen Sporophyten, $CM \times nG$ einen fertilen. In der Nachkommenschaft des fertilen treten aber keine CM-Gametophyten mehr auf (Abb. 7). Für den Reziprokenunterschied ist das Genom nicht verantwortlich

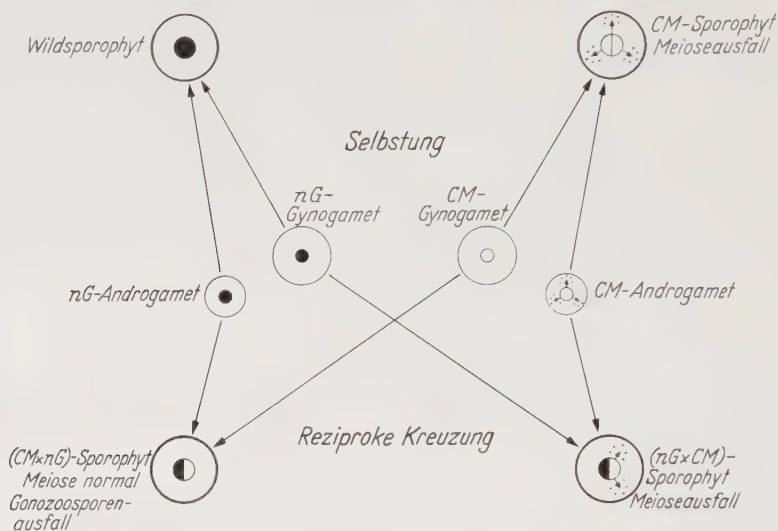


Abb. 7. Schema der reziproken Kreuzung der Wildform mit dem CM-Stamm und der Selbstung der beiden Stämme. ● Normales Genom; ○ abgeändertes Genom; → Wirkungen des CM-Genoms auf das Plasma des Androgameten, verantwortlich für die Unfähigkeit zur Meiosporenbildung

zu machen. Vielmehr muß ein Faktor, der nur durch den Androgameten wirkungsfähig übertragen werden kann, den Grund für die sporophytische Sterilität bilden. Es blieb aber die Frage offen, ob die Sterilität der Meiosporangien nur auf den vom CM-Mikrogameten in die Zygote eingeführten Faktor zurückzuführen ist. Eine möglicherweise gleichzeitig letale Wirkung des CM-Genoms sollte an den fertilen Hybridsporophyten aus der Kreuzung $CM \times nG$ nachzuweisen sein, die ja in der Nachkommenschaft nur noch normale Gametophyten besitzen. Das Ausbleiben der CM-Gametophyten wäre als genomabhängig erklärbar, wenn sich folgendes feststellen ließe: Die Dauersporangien fertiler Bastardsporophyten enthalten im Vergleich zum Wildsporophyten entweder weniger Gonen, da ein Teil infolge eines Letalfaktors (oder mehrerer Faktoren) sofort nach der Meiose zugrunde geht, oder die Dauersporangien entlassen zwar die normale Menge an Gonozoosporen, aber ein danach wirksamer Letalfaktor vernichtet einen Teil der Gonozoosporen. Diese Annahmen wurden geprüft.

Da die Gonozoosporen des vegetativ vermehrten Wildstammes trotz normaler Meiose eine geringe Keimungsfähigkeit aufwiesen (2,4% statt etwa 50%), diente eine Einsporkolonie des Mischgametophyten MX als Kreuzungspartner anstelle des Wildgametophyten. Die Kreuzungssporophyten zeigten die erwarteten Reziprokenunterschiede. Von 7 Sporophyten

aus der Kreuzung CM \times MX wurden insgesamt 880 Gametophyten isoliert, die CM-Form trat auch unter ihnen nicht mehr auf.

Die Frage, wie viele Meiosporen in den Dauersporangien von Kreuzungs- und Selbstungs-sporophyten entstanden, wurde an jeweils 4 Sporophyten geklärt. Dazu wurden meiose-bereite Dauersporangien mit einer Kapillarpipette einzeln auf 1%igen LP-Agar plattiert. Die freigesetzten Meiosporen lagerten sich um die leeren Sporangienhüllen und ließen sich nach vorsichtigem Ausstreichen mit einer Glasnadel leicht auszählen. Die jungen Keimpflanzen wurden zur Untersuchung auf ihre Entwicklungsfähigkeit auf Normalagar übertragen.

Die Meiosporangien der (CM \times MX)-Bastardpflanzen entließen im Mittel 89 ± 2 Sporen, aus den Sporangien der MX-Selbstungs-sporophyten traten 85 ± 3 Sporen aus (Abb. 8). Beide Sporophyten erwiesen sich demnach als gleichwertig in der Bildung von haploiden Zoosporen. Die Meiosporen verschiedener Herkunft unterschieden sich jedoch in ihrer Fähigkeit, sich zu lebensfähigen Pflanzen zu entwickeln. Bei den geprüften Selbstungspflanzen wuchsen von 5854 gezählten Meiosporen (aus 67 Dauersporangien) bei der angewendeten Technik 2938 (50%) zu völlig differenzierten Mischgametophyten aus. Von 7774 Meiosporen aus 87 Dauersporangien der Hybridsporophyten konnten nur 1145 Keimpflanzen isoliert werden. Von diesen entwickelten sich 350

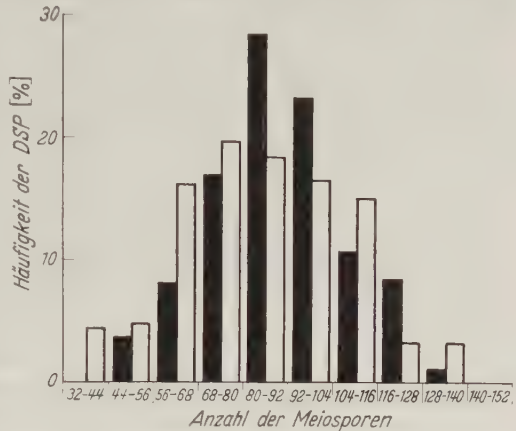


Abb. 8. Häufigkeitsverteilung der Anzahl der Meiosporen pro Dauersporangium. Schwarze Säulen = Meiosporen von Sporophyten der Kreuzungen CM \times MX (Zahl der geprüften Dauersporangien = 87). Weiße Säulen = Meiosporen von MX-Sporophyten (Zahl der geprüften Dauersporangien = 67)

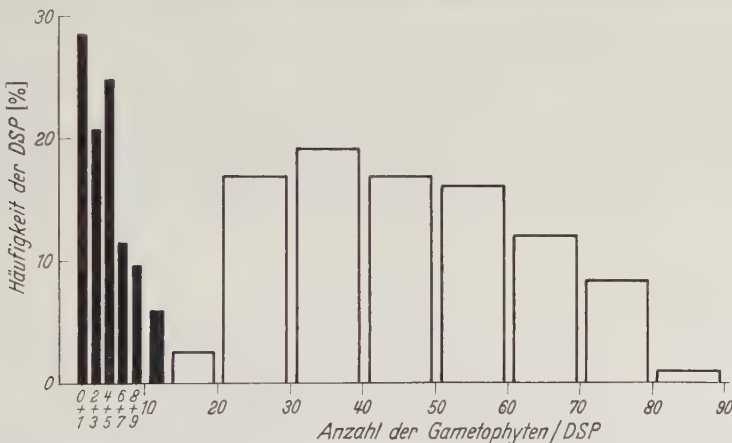


Abb. 9. Häufigkeitsverteilung der Anzahl lebensfähiger Gametophyten pro Dauersporangium. (Weitere Erklärung s. Legende zu Abb. 8)

zu lebensfähigen Mischgametophyten (4,5%), die restlichen Keimpflanzen starben in einem frühen Entwicklungsstadium ab. Keines der Meiosporangien enthielt einen mit normalen Meiosporangien vergleichbaren Anteil an voll entwicklungsfähigen Sporen (Abb. 9).

Gametophyten mit dem CM-Genom sterben also auf früher Entwicklungsstufe ab.

c) **Folgerungen aus den Versuchsergebnissen.** α) Die schwache Ausfärbung der Mikrogametangien des CM-Gametophyten war dadurch bedingt, daß die Gesamtkonzentration an Carotinen nur 20% derjenigen des Wildstammes ausmachte. Die Mikrogameten konnten trotz ihres geringen Pigmentgehaltes Makrogameten befruchten und mit diesen lebensfähige Zygoten bilden. Entscheiden allein die Carotine in bestimmter Konzentration über den Geschlechtscharakter, könnten die CM-Mikrogameten ein abgeschwächtes männliches Verhalten zeigen. Normale männliche Gameten fusionierten aber niemals mit CM-Androgameten. Es ist wahrscheinlich, daß die Carotine nicht die Voraussetzung für normales sexuelles Verhalten der Androgameten bilden, sondern nur eine indirekte Folgeerscheinung des Differenzierungsprozesses sind.

Die experimentellen Befunde decken sich mit solchen von TURIAN. Er konnte bei *Allomyces* mit Diphenylamin die Produktion der Carotine fast völlig unterbinden, dennoch bildeten die Mikrogameten mit Makrogameten keimfähige Zygoten (TURIAN 1952, TURIAN und HAXO 1954).

β) Der Reziprokenunterschied der Kreuzungssporophyten muß auf den CM-Androgameten zurückgeführt werden. Wir dürfen folgern, daß bei dem Differenzierungsprozeß des CM-Mikrogametangiums unter dem Einfluß eines nachweislich veränderten Genoms ein System aufgerichtet wird, das den Reziprokenunterschied verursacht. Das gleiche Genom CM bildet im Makrogameten dieses System nicht. Im CM-Mikrogameten werden also Bedingungen geschaffen, die für einzelne Eigenschaften des Sporophyten verantwortlich sind. Der normale Gynogamet hebt in der Zygote jene Bedingungen nicht auf.

Die substantielle Grundlage des hier angetroffenen Reziprokenunterschiedes ist nicht als Plasmakomponente aufzufassen, sonst wäre zu erwarten, daß der plasmareichere Makrogamet ebenfalls Überträger der Sporophytensterilität ist. Es handelt sich vielmehr um eine Genomwirkung, die unter den entwicklungsphysiologischen Bedingungen des Androgameten manifest wird und ihren Einfluß über das Plasma in den Differenzierungsprozessen nur dann ausübt, wenn das betreffende Genom als väterliches in die Kreuzung eingeführt wird (vgl. Abb. 7). Die Beobachtung, daß der normale Makrogamet den Einfluß des anomalen Mikrogameten nicht aufheben kann, weist auf die besondere entwicklungsphysiologische Rolle des Androgameten bei der Befruchtung der Blastocladien hin.

Summary

1. Treatments were made in an attempt to alter the pattern of differentiation in a haploid gametophyte, colchicine-diploid gametophyte and a diploid sporophyte. Metabolic poisons, which block glycolysis, tricarboxylic acid cycle and protein synthesis, showed no effects on differentiation of gametangia and sporangia.

2. From selfed crosses of a gametophyte that formed excess female gametangia there resulted new types, which differed from the wild-type gametophyte in the ratio of male:female gametangia, in gametangial arrangement, and in the size of the sexual organs. There is evidence that heteroploid sets of chromosomes may be responsible for these aberrations.

3. A gametophyte (CM) with decreased carotene-production was isolated. The male gametes, despite the reduced amounts of carotenes, were able to pair. The resistant sporangia of CM-sporophytes from selfed crosses proved to be sterile.

4. Reciprocal crosses between wild-type and CM-gametophytes gave rise to reciprocal differences among the F_1 -sporophytes. These results can be explained by the assumption, that in the male gamete only (and not in the female) and dependant on the influence of a mutated genome, a differentiation occurs that controls certain characteristics of the sporophyte. Plasmatic inheritance does not need to be invoked for the reciprocal differences found.

Die Experimente zur vorliegenden Arbeit wurden von August 1954 bis zum Frühjahr 1959 im Botanischen Institut der Universität Köln durchgeführt. Meinem Lehrer, Herrn Professor Dr. J. STRAUB, danke ich für die Überlassung des Themas und für sein stetes Interesse am Fortgang meiner Arbeit.

Literatur

- BETZ, A.: Untersuchungen über Verhalten und Wirkungen der Vitalfarbstoffe Prune pure und Acridinorange sowie Beobachtungen über das Redox-Potential in Zellen höherer Pflanzen. *Planta* (Berl.) **41**, 323—357 (1953).
- BOGEN, H. J., u. M. KESER: Eiweiß-Abbau durch Acridinorange bei Hefezellen. *Physiol. Plantarum* (Cph.) **7**, 446—462 (1954).
- CANTINO, E. C.: The role of metabolism and α -ketoglutarate oxidase in the growth and differentiation of the aquatic phycomycete *Blastocladiella emersonii*. *Trans. N.Y. Acad. Sci.*, Ser. II **15**, 159—163 (1953).
- The relation between cellular metabolism and morphogenesis in *Blastocladiella*. *Mycologia* **48**, 225—240 (1956).
- EBERHARDT, F.: Enzymgifte (Besprechung). *Z. Bot.* **40**, 332—339 (1952).
- EMERSON, R.: An experimental study of the life cycles and taxonomy of *Allomyces*. *Lloydia* **4**, 77—144 (1941).
- , and D. L. FOX: γ -carotene in the sexual phase of the aquatic fungus *Allomyces*. *Proc. roy. Soc. B* **128**, 275—293 (1940).
- , and C. M. WILSON: The significance of Meiosis in *Allomyces*. *Science* **110**, 86—88 (1949).
- — Interspecific hybrids and the cytogenetics and cytotaxonomy of *Euallomyces*. *Mycologia* **46**, 393—434 (1954).
- FOLEY, I. M.: The occurrence, characteristics, and genetic behavior of albino gametophytes in *Allomyces*. *Amer. J. Bot.* **45**, 639—648 (1958).
- GOODWIN, T. W.: In K. PAECH u. M. V. TRACEY, *Moderne Methoden der Pflanzenanalyse*, Bd. 1. Berlin-Göttingen-Heidelberg: Springer 1955.
- HATCH, W. R.: Gametogenesis in *Allomyces arbuscula*. *Ann. Bot.* **49**, 623—649 (1935).
- Resistant sporangia on sexual plants of *Allomyces arbuscula*. *Mycologia* **36**, 309—311 (1944).
- INGRAHAM, I. L., and R. EMERSON: Studies of the nutrition and metabolism of the aquatic Phycomycete, *Allomyces*. *Amer. J. Bot.* **41**, 146—153 (1954).
- KNIEP, H.: Über den Generationswechsel von *Allomyces*. *Z. Bot.* **22**, 433—441 (1930).
- KÖLBEL, H.: Quantitative Untersuchungen über die Farbstoffspeicherung von Acridinorange in lebenden und toten Hefezellen und ihre Beziehung zu den elektrischen Verhältnissen in der Zelle. *Z. Naturforsch.* **2b**, 382—392 (1947).
- RITCHIE, D.: The formation and structure of zoospores in *Allomyces*. *J. Mitchell Soc.* **63**, 168—205 (1947).
- ROREM, I. S., and L. MACHLIS: The ribonucleoprotein nature of large particles in the meio-sporangia of *Allomyces*. *J. biophys. biochem. Cytol.* **3**, 879—888 (1957).
- SCHÜMMELFEDER, N., K. J. EBSCHNER u. E. KROGH: Die Grundlage der differentiellen Fluorochromierung von Ribo- und Desoxyribonucleinsäure mit Acridinorange. *Naturwissenschaften* **44**, 467—468 (1957).
- SÖRGEL, G.: Untersuchungen über den Generationswechsel von *Allomyces*. *Z. Bot.* **31**, 401 bis 446 (1937).
- SOST, H.: Über die Determination des Generationswechsels von *Allomyces arbuscula*. *Arch. Protistenk.* **100**, 541—564 (1955).
- STEIN, W.: Zur Inaktivierung von *Bacterium coli* durch Acridinorange. *Naturwissenschaften* **40**, 26—27 (1953).

- STUMM, C.: Die Analyse von Genmutanten mit geänderten Fortpflanzungseigenschaften bei *Allomyces arbuscula*. Z. Vererb.-Lehre **89**, 521—539 (1958).
- TURIAN, G.: Caroténoides et différenciation sexuelle chez *Allomyces*. Experientia (Basel) **8**, 302 (1952).
- Recherches sur la morphogenèse sexuelle chez *Allomyces*. Bull. Soc. bot. Suisse **67**, 458—486 (1957).
- , and F. T. HAXO: Minor polyene components in the sexual phase of *Allomyces javanicus*. Bot. Gaz. (Chicago) **115**, 254—260 (1954).
- WETTSTEIN, F. v.: Über einige Beobachtungen und experimentelle Befunde bei Laubmoosen. Ber. dtsch. bot. Ges. **60**, 394—414 (1942).
- WILSON, C. M.: Meiosis in *Allomyces*. Bull. Torrey bot. Club **79**, 139—160 (1952).

PETER FÄHRICH, Institut für Landwirtschaftliche Botanik der Universität,
Bonn, Meckenheimer Allee 176

SPONTANE MUTATION VON EINER MONOAUXOTROPHIE ZU EINER ANDEREN IN EINEM SCHRITT (AUXOTROPHIESPRUNG-MUTATION)

Von

R. W. KAPLAN

(Eingegangen am 17. September 1960)

Der Stamm CV von *Serratia marcescens*, welcher, wie bei dieser Bakterienart üblich, 1—2% Farbmутanten spontan erzeugt, produziert daneben im Unterschied zu anderen Stämmen spontan auch etwa 0,5% verschiedene Auxotrophie-mutanten. Diese können leicht ohne Anreicherungs-methode durch bloßes Überstempeln der auf Komplettagar (Difco Nutrientbroth) gewachsenen Kolonien auf Minimal(Mi)-Boden (Glycerin-Salz-Agar, wo die Auxotrophen nicht wachsen) gefunden werden. Ihr Anteil wird durch UV nicht erhöht, hingegen steigt der der Farbmутanten bis über 30% (KAPLAN 1959). Etwa die Hälfte der isolierten Auxotrophen ist instabil, d. h. mutiert häufig spontan zur Anauxotrophie (= Prototrophie) zurück. Von 82 stabilen, also schwach oder kaum „rück“-mutierenden Auxotrophiestämmen wurde der Wuchsstoffbedarf geprüft. Die meisten (60) benötigten nur *einen* Stoff zum Wachsen (Monoauxotrophie), z. B. eine der Aminosäuren. Bei wenigen (10) fanden sich Mehrfachbedarfe (Polyauxotrophie), etliche (12) blieben unbestimmbar. Zur Bedarfbestimmung diente eine auxanographische Methode, bei der eine Mi-Agarplatte mit einer dichten Zellsuspension (10^8 — 10^9 Zellen) in Weichagar (0,7%) übergossen und dann mit 9 Papierblättchen belegt wurde, die je mit einer anderen Lösung von 8 Stoffen getränkt waren. Die 9 Lösungen waren so zusammengesetzt, daß jeder von 36 Stoffen in je 2 Lösungen vorkam (RYAN 1954). Der Bedarf für einen der Stoffe wird also durch Wuchs der Bakterien im Diffusionshof um zwei bestimmte der Blättchen angezeigt. Wuchshöfe um mehrere Blättchen zeigt alternativen Bedarf für mehrere Stoffe an, Wuchs um nur eines oder zwischen zweien deutet auf Polyauxotrophie. Durch Auxanographie mit Kriställchen der angezeigten Einzelstoffe wurden die Befunde erhärtet.

Unter den 60 gefundenen Monoauxotrophen fanden sich einige, welche außer den dichten Wuchshöfen aus Mikrokolonien des Grundrasens um 2 Blättchen noch um zwei andere Blättchen je einen Schwarm aus einigen Dutzenden oder Hunderten \pm großen Kolonien ergaben. Isolate dieser größeren Kolonien zeigten im Einzelstofftest Wuchs nur durch den von beiden Blättchen mit Kolonieschwarm angezeigten Stoff oder wenigstens starke Wuchsförderung durch ihn. Gegenüber dem anderen Stoff, den die Ausgangsmutante benötigte, waren sie indifferent. Die ursprüngliche *auxotrophe Mutante* schien also *spontan* mit erheblicher Rate zu einer anderen Auxotrophie weitermutiert zu sein, wobei der *erste Stoffbedarf* verschwand. Bisher fanden sich folgende 5 Typen solcher Mutanten: Eine Argininbedürftige, die zu Niacinbedarf weitermutiert (*arg* 1⁻ \rightarrow *nia*⁻); eine andere Argininauxotrophe, die zum alternativen Bedarf für Histidin, Adenin oder Hypoxanthin mutiert (*arg* 2⁻ \rightarrow *his*, *ad*, *hyx*⁻); eine mit Threonin- zu Methioninbedarf mutierende (*thr*⁻ \rightarrow *met*⁻); eine Prolinbedürftige zu Histidinbedarf

(*prol* \rightarrow *his*) und eine Leucinauxotrophe zu alternativ Adenin- oder Hypoxanthinbedarf (*leu*⁻ \rightarrow *ad*, *hyx*⁻) mutierend.

Wegen der hohen Spontanmutabilität der „Auxotrophie-Gene“ von *Serratia* CV war es nächstliegend, diese „Auxotrophiesprung“-Mutationen dadurch erklären zu wollen, daß die erste Auxotrophe zunächst in einer Zwischenmutation zur Anauxotrophie „zurück“-mutiert, und daß diese „Rück“-Mutante dann in einem anderen Gen häufig zur 2. Auxotrophie weitermutiert. In entsprechenden Ausplattungen der Mutanten *arg* 2⁻ sowie *leu*⁻ erschienen auf Mi-Boden jedoch keine anauxotrophen Kolonien, welche die Zwischenmutante repräsentieren könnten: Die *leu*⁻-Mutante bildete nach Aussaat von etwa 10^7 — 10^8 Zellen auf Mi-Boden nur sehr wenige (etwa 1 Dutzend) anauxotrophe Kolonien und auch keinerlei mit dem Präpariermikroskop sichtbare Zwergkolonien. Bei Auflegen eines Adeninkriställchens auf den beimpften Mi-Boden wuchsen jedoch Hunderte *ad*⁻-Kolonien im Diffusionshof des Adenins. Die Auxotrophe *arg* 2⁻ ergab bei Plattung auf Mi-Agar zwar viele winzige, also schwachwüchsige Mutantenkolonien. Diese können jedoch nicht die Zwischenmutanten darstellen. Denn sie *alle* wachsen im Bereich von aufgelegtem Histidin zu großen Kolonien, wie dadurch angezeigt wurde, daß die Zahl dieser winzigen, auf Mi-Agar schwachwüchsigen Kolonien in einer Flächeneinheit im histidinfreien Gebiet der Platten die gleiche war wie die der wuchsgeförderten im histidinhaltigen Gebiet. Auch die durch Heraus-picken solcher Kolonien isolierten *his*-auxotrophen Weitermutantenstämme wuchsen auf Mi-Agar in geringem Maße und wurden durch Histidin (oder Adenin oder Hypoxanthin) stark gefördert: sie sind also unvollständig auxotroph (*leaky*). Wir müssen somit folgern, daß der Zwischenschritt nicht existiert oder daß die Zwischenmutante äußerst mutabel ist, und zwar *nur* zur 2. Auxotrophie (*his*) weitermutiert.

Diese letztere, an sich schon unwahrscheinliche Möglichkeit konnte bei der *leu*⁻-Mutante ausgeschlossen werden. Falls nämlich der Zwischenschritt geschähe, würde er das „Leucin-Gen“ zum *leu*⁺-Allel überführen, und die Weitermutante hätte den Genotyp *leu*⁺ *ad*⁻. Würde dann das *ad*⁻-Allel zur Anauxotrophie *ad*⁻ zurückmutieren, dann dürften diese Rückmutanten (*leu*⁺ *ad*⁻) nicht leucinbedürftig sein: sie müßten auf Mi-Boden wachsen. Würde der Zwischenschritt nicht existieren, so würde die Erstmutante mit Genotyp *leu*⁻ *ad*⁻ zu *leu*⁻ *ad*⁻ mutieren, und das Verschwinden der Leucin-Auxotrophie in dieser Weitermutante wäre als eine Suppressorwirkung des *ad*⁻-Gens auf das *leu*⁻-Gen anzusehen (*leu*⁽⁻⁾ *ad*⁻). Bei Rückmutation von *leu*⁽⁻⁾ *ad*⁻ nach *leu*⁻ *ad*⁺ sollte dann die durch das weiterbestehende *leu*⁻-Allel bedingte, vorher durch *ad*⁻ unterdrückte (*leu*⁽⁻⁾) Leucinbedürftigkeit wieder erscheinen. Dies wurde tatsächlich gefunden: In einem Versuch wurden drei getrennte Isolate der *leu* *ad*⁻-Weitermutante in dichter Suspension (etwa 10^8 Zellen) auf Minimalmedium geplatet und an einer Stelle Leucin aufgelegt, welches diese Weitermutante nicht zum Wuchs veranlaßt. Im Diffusionshof des Leucins erschien nun ein Schwarm von einigen Hunderten großer Kolonien, während sonst die Platte nur sehr wenige sichtbare Kolonien zeigte. Abimpfungen dieser großen, leucinabhängigen Kolonien ergaben Stämme, die der *leu*⁻-Ausgangsmutante glichen, insbesondere wie diese wieder zur *ad*, *hyx*-Auxotrophie mutierten. Sie zeigen also Rückmutation des *ad*-Allels zu *ad*⁺ an und zugleich das Verschwinden der Suppression der Phänwirkung des noch vorhandenen *leu*⁻ durch *ad*⁻.

Damit ist bewiesen oder zumindest wahrscheinlich gemacht, daß bei der „Auxotrophiesprung“-Mutation in der Ausgangsmutante ein weiteres Auxotrophie-Gen zu einem Allel mutiert, welches als Suppressor der 1. Auxotrophie wirkt. Dies ist nach obigen Versuchen ziemlich sicher für die Mutation *leu* \rightarrow *ad*, dürfte aber auch für die anderen genannten Fälle zutreffen. In diesen Fällen ist obiger Rückmutationstest leider infolge der nur unvollständigen Auxotrophie der Weitermutante und des dadurch gegebenen \pm erheblichen Wuchses auf Mi-Boden nicht verwendbar. Das Ergebnis des Rückmutationsversuches schaltet auch zwei andere, an sich unwahrscheinliche Erklärungsmöglichkeiten weitgehend aus: Einerseits, daß beide Auxotrophien durch Allele desselben Gens bedingt sind, andererseits, daß die Weitermutation korreliert mit einer Rückmutation des ersten Auxotrophiegens geschieht. Es verbleibt also die Annahme, daß in den gefundenen Fällen die 2. *Auxotrophiemutation als Suppressor für die erste* funktioniert.

Hierfür könnte folgende einfache Erklärung herangezogen werden: Die zweite Mutation blockiert einen Schritt in einer Reaktionskette für die Bildung eines „Wuchsstoffes“ (z. B. Adenin), wodurch ein Zwischenprodukt vor diesem Block akkumuliert wird. Dieser Stoff überwindet den von der ersten Mutation in einer anderen Reaktionsfolge (für Bildung eines anderen Wuchsstoffes, z. B. Leucin) verursachten Block dadurch, daß er das fehlende Produkt dieser blockierten Reaktion ersetzt, also mit ihm die entsprechende lebenswichtige Synthese vollzogen werden kann. Es würde demnach die 1. Auxotrophie durch intrazelluläres „Füttern“ der unterbrochenen 1. Synthesekette mit dem Akkumulat der 2. Reaktionskette beseitigt. Dies setzt jedoch voraus, daß in beiden gesteuerten Reaktionsfolgen ähnliche Zwischenprodukte vorkommen, daß also z. B. Stoffe der Leucinbildung für die Purinsynthese, der Niacin- für die Argininsynthese verwendet werden können. Diese Erklärung kommt jedoch schwerlich infrage, weil die bisher gefundenen Auxotrophiesprünge zwischen biochemischen Reaktionen geschehen, die wohl kaum etwas miteinander gemeinsam haben (außer vielleicht *thr* \rightarrow *met*). Auch zeigte sich in keinem der gefundenen 5 Fälle, daß die Zweitmutanten die Erstmutanten syntrophisch füttern. Die hypothetischen „fütternden“ Akkumulate würden also nicht ausgeschieden, wie dies sonst meist zutrifft; sie müßten in allen Fällen hochmolekular, impermeabel (z. B. Polypeptide als Enzymvorstufen) oder instabil sein. Endgültig kann diese Erklärung natürlich nur durch eine eingehende biochemische Analyse der Mutanten ausgeschieden werden. Vorerst ist sie nur recht unwahrscheinlich.

Nach diesen Befunden und Überlegungen ist es also wahrscheinlich, daß das Zusammenwirken der beiden „Auxotrophie“-Gene, z. B. *leu* und *ad*, nicht auf der Ebene der Reaktionsprodukte der (gesteuerten) Enzymwirkung geschieht, sondern bei der *Bildung der Enzyme* selbst. Es darf also angenommen werden, daß die Zweitmutation (z. B. \rightarrow *ad*⁻) die von der Erstmutation (z. B. \rightarrow *leu*⁻) unterbundene Bildung eines (für die Leucinsynthese nötigen) Enzyms wieder erlaubt. Das heißt aber, daß die Bildung dieses Enzyms nicht nur von dem ersten Gen (*leu*), sondern auch vom allelen Zustand eines 2. Gens (*ad*) determiniert wird.

Daß bisher solche Auxotrophiesprung-Mutationen noch nicht bei anderen Objekten beobachtet wurden, könnte einerseits an der verwendeten Auxanographiemethode, vor allem aber an der hohen Spontanrate für Auxotrophiemutationen des verwendeten *Serratia*-Stammes liegen. Bei den üblichen, selten

weitermutierenden Auxotrophen, z. B. von *Escherichia coli*, würden die anders-auxotrophen Weitermutanten nicht als vielzähliger Schwarm von Kolonien um die Lösungsblättchen auffallen.

Ein den Auxotrophiesprüngen ähnliches Hin- und Hermutieren zwischen der alternativen Bildung zweier spezifischer Proteine wurde von LEDERBERG und JINO bei Salmonellen studiert. Hier kann das Geißelantigen eines Stammes zu einem von mehreren Serotypen gehören, die in 2 Gruppen, „Phasen“ genannt, einteilen sind. Diese 2 Phasen entsprechen 2 Genen, H_1 und H_2 , und jeder Serotyp innerhalb einer Phase entspricht einem von deren Allelen. Zum Beispiel gehören die Antigene a, b und i zur Phase 1, sind also durch Allele des H_1 -Gens determiniert, die Antigene 1,2 und enx durch Allele des Phase 2-Gens H_2 . Ein Antigen der Phase 1 kann durch häufige Mutation durch eines der Phase 2 ersetzt werden sowie umgekehrt eines der Phase 2 durch eines von 1. Dabei geschieht das häufige Hin- und Hermutieren immer nur zwischen zwei ganz bestimmten Antigentypen (Allelen) beider Phasen, z. B. $i \rightleftharpoons enx$ oder $b \rightleftharpoons 1.2$. Mit Hilfe von Transduktion zeigten die Autoren, daß jedes H_2 -Allel in zwei alternativen „Zuständen“ vorkommen kann, einem „hypo-“ und einem „epistatischen“; der epistatische unterdrückt die Ausprägung des Gens H_1 (z. B. als Antigen b) und läßt nur die von H_2 (z. B. als 1.2) zu, der hypostatische veranlaßt die umgekehrte Manifestation. Das Hin- und Hermutieren zwischen den 2 Phasen besteht also im mutativen Oszillieren zwischen diesen beiden alternativen Zuständen von H_2 . Möglicherweise entsprechen diesen 2 Zuständen aber die 2 Allele eines weiteren Gens, das mit H_2 eng gekoppelt ist und alternativ auf H_1 und H_2 als Suppressor wirkt. Daß diese Suppression bzw. Epistasie auf der Ebene der Proteinsynthese (Antigenbildung) liegt, ist wahrscheinlich, wenn auch nicht erwiesen. Es würde also der hypostatische Zustand des H_2 -Gens (bzw. jenes gekoppelten Suppressors) die Bildung des dem H_1 zugehörigen Antigens der Phase 1 mit determinieren, ähnlich wie unser *ad*⁻-Allel für die Bildung der Leucin-Unabhängigkeit und also wohl des dafür notwendigen Enzyms im *leu*⁻-Genotyp verantwortlich ist.

Die Entstehung einer neuen Auxotrophie — nicht das Verschwinden, wie in unserem Falle — als Wirkung des Allels eines anderen Gens (welches also als Modifikator für das „Autotrophie“-Gen wirkt), könnte in den Versuchen von KOHIYAMA und IKEDA an *Bac. subtilis* und den von BRADLEY an *Streptomyces* vorliegen. Bei *Bac. subtilis* entstand nach Rekombination eine in keinem der 2 Eltern vorhandene Uracil-Auxotrophie, die eine Nebenwirkung des *str*^r-Allels (an Stelle von *str*^s) sein könnte. Auch in den Kreuzungen von *Streptomyces* traten neue, in den Eltern fehlende Auxotrophien auf. Ob in diesen Fällen die Wirkung nicht in der Ebene der Reaktionsprodukte, sondern in der der Synthese der Enzyme liegt, ist jedoch offen; immerhin ist es nicht ausgeschlossen.

Die hier dargelegten Ergebnisse sind für die Theorie der Genwirkung von Bedeutung. Nach der weithin angenommenen, wohlbegründeten „Ein Gen ein Enzym“-Hypothese von BEADLE determiniert ein Gen die Bildung eines bestimmten Enzyms, z. B. das Gen *try* den Aufbau der Tryptophan-Synthetase. Mutative Veränderung des Gens ändert die Aktivität des Enzyms, wohl indem sie ein anderes Aminosäure(AS-)muster in diesem Protein (wahrscheinlich an einer nur eng begrenzten Stelle) verursacht (z. B. BONNER 1956). Dies wird oft so formuliert, daß die Gen-DNS die „Information“ über das AS-Muster des Enzyms in ihrem

Basen-Muster enthalte und daß die Zelle diese DNS-„Schrift“ in jene Protein-„Schrift“ übersetze. Hierfür bestehen nun 2 Möglichkeiten:

Im 1. Falle könnte zur eindeutigen Festlegung des AS-Musters des Proteins das Basenmuster des *einen* „zugehörigen“ Gens ausreichen; das übrige Genom determiniert nur die unspezifischen zellulären Apparate zur Übersetzung der Schriften und zum Auf- und Zusammenbau der AS. In diesem Sinne können z. B. die Befunde von DEMEREC u. Mitarb. (1955) gedeutet werden, wonach Gene für die Determination der Enzyme, welche in einer biochemischen Reaktionskette hintereinander arbeiten, im bakteriellen Chromosomen oft in entsprechender Reihe nebeneinanderliegen, z. B. die Gene der Tryptophan- oder Histidin-Synthese.

Im 2. Falle wäre das Basenmuster mehrerer Gene bzw. Genomabschnitte, vielleicht sogar des ganzen Genoms, für die Determination des AS-Musters eines einzigen Enzyms nötig; außer z. B. dem *try*-Gen wäre auch das spezifische Basenmuster anderer Gene an der Bildung des AS-Musters der Tryptophansynthetase mitbeteiligt. Das *try*-Gen würde zwar die Tryptophansynthese (auch) determinieren, aber nur auf einem ganz bestimmten „genetischen Hintergrund“, d. h. bei einer bestimmten Allelenkombination sonstiger Gene. Wir dürften dann nicht sagen, daß ein Gen *die* Information über die Spezifität eines Enzyms enthält, sondern daß es nur einen Teil dieser Information trägt, der Rest läge in anderen Genen im übrigen Genom.

Die geschilderte Beobachtung von „Auxotrophiesprung“-Mutationen sowie der anderen erwähnten Fälle scheint nun eher für diese 2. Möglichkeit als für die 1. zu sprechen. Denn hier wird ja das mutierte Gen der Weitermutante, z. B. *ad*⁻, infolge seiner Suppressor-Wirkung verantwortlich für die vom ersten mutierten Gen, z. B. *leu*⁻, gesteuerte biochemische Reaktion; es trägt also das *ad*⁻-Allel des „*ad*⁻“-Gens auch Information über die Durchführung des betreffenden Reaktionsschrittes der Leucinsynthese (wohl über die Bildung des AS-Musters eines dabei wirkenden Enzyms): *Das „ad“-Gen ist also durch seine Mutation zum ad“-Allel ein „leu“-Gen geworden!* Die Beteiligung von anderen Genen an der Determination der Bildung eines „gengesteuerten“ Enzyms wurde bereits durch die schon seit langem bekannten „normalen“ Suppressormutationen nahegelegt; z. B. durch die Suppressoren, welche den vom Allel *try*⁻ verursachten Verlust der Tryptophansynthetase wieder (zum Teil) restituieren (z. B. BONNER). Jedoch lassen diese Suppressoren keinen spezifischen Eingriff in andere biochemische Reaktionen erkennen, so daß die Möglichkeit verblieb, daß sie „versprengte“ Teile (infolge früherer Translokations-Mutation) des von ihnen affizierten Gens, z. B. *try*, darstellen. Die hier beschriebenen „Suppressoren“ bei den Auxotrophiesprungmutationen sind jedoch sicher Gene, welche noch andere Reaktionen als die suppressierte steuern bzw. vor der Mutation spezifisch steuerten.

Damit wird aber die Bezeichnung eines Gens nach der von einem seiner Allele verursachten Auxotrophie bzw. dem von ihm determinierten Enzym oder sonstigen Protein problematisch. Die damit verbundene Vorstellung der Zusammengehörigkeit eines Gens mit nur einem Enzym ist zwar insofern berechtigt, als viele oder wenigstens einige seiner Allele bei bestimmtem Genomhintergrund eine bestimmte biochemische Reaktion über die Determination des katalysierenden Enzyms hemmen, andere Allele diese fördern. Es gibt aber offenbar auch Allele, die (daneben noch ?) in den Ablauf ganz anderer Reaktionsschritte bestimmend

eingreifen (z. B. unser *ad* in die Leucin- und *nia* in die Argininsynthese). Für die Zelle genügt es anscheinend nicht (immer !) für die Produktion eines Proteins, die in nur *einem* Gen liegende Information zu lesen, sondern sie benötigt zur Erzeugung des spezifischen AS-Musters auch die Information aus sonstigen Teilen des Genoms. Dies paßt gut zu Ergebnissen von McFALL, PARDEE u. STENT, nach denen zur Synthese eines adaptiven Enzyms bei *E. coli* das Genom unversehrt von P^{32} -Zerfällen sein muß; eine P^{32} -Läsion in der DNS verhindert möglicherweise die Übernahme der Gesamtinformation über das spezifische Baumuster des Enzyms aus dem Gesamtgenom.

Bezüglich der „Information“, welche über die Bildung eines Proteins im Genom (DNS) niedergelegt ist, können wir a priori 2 Teile unterscheiden: Einerseits diejenige über das Baustein(AS)-Muster, also über die „Spezifität“, andererseits über die Bildung der Bausteine sowie die *unspezifischen Zellapparaturen*, die diese Bausteine zu dem spezifischen Muster zusammensetzen. Der letztere „unspezifische“ Teil der Information ist sicherlich auf viele verschiedene Gene verteilt, wie allein schon die Vielzahl der an der AS-Synthese beteiligten Enzyme und sie determinierenden Gene anzeigt. Da die beobachtete Sprungmutation *leu*⁻ → *ad*⁻ sehr wahrscheinlich (s. oben) darin besteht, daß das im *leu*⁻-Genotyp fehlende „Leucin“-Enzym durch die Mutation des *ad*-Gens von *ad*⁺ zu *ad*⁻ wieder gebildet werden kann, so trägt also auch das *ad*-Gen (als Allel *ad*⁻) „Information“ über die Bildung des „Leucin“-Enzyms. Unsere Befunde deuten demnach an, daß auch die Information über die Spezifität des Proteins auf mehrere Gene verteilt sein kann, nicht nur auf ein einziges. Anscheinend bezieht sich die Information in einem Gen (Cistron, Funktionsgen) zwar überwiegend auf nur ein einziges Enzym. Jedoch kann ein Teil davon infolge Mutation dieses Gens zu gewissen Allelen offenbar auch für andere Enzyme verwendet werden.

Die Deutsche Forschungsgemeinschaft unterstützte dankenswerterweise die Untersuchungen durch eine Sachbeihilfe.

Frau L. SCHEIB danke ich für gewissenhafte technische Assistenz.

Summary

Serratia strain CV produces spontaneously about 0.5% auxotrophic mutants of different types. By means of a special auxanographic technique, among about 60 monoauxotrophs, 5 were found which frequently and spontaneously mutate to a certain other auxotrophic state losing the first one (*arg* 1⁻ → *nia*⁻; *arg* 2⁻ → *his*⁻, *ad*, *hyx*⁻; *thr*⁻ → *met*⁻; *prol*⁻ → *his*⁻; *leu*⁻ → *ad*, *hyx*⁻). It could be shown that this auxotrophic leap happens in ohne step without a prototrophic intermediate step. By backmutation experiments with the mutations *leu*⁻ ⇌ *ad*⁻ it was shown that the second auxotrophy acts as a suppressor mutation to the first auxotrophy. Since the biochemical reaction sequence blocked by the first mutation seems not to be related to the chain blocked by the second mutation, and since the second mutants do not feed the first mutants syntrophically, it is not probable that the suppression of the first auxotrophy is caused by a substance accumulated as an effect of the second mutation, removing the first auxotrophy by intracellular "feeding... Rather, the second "auxotrophy"-gene (in its mutated, suppressing allelic state, e. g. *ad*) seems to contribute information to the production of the enzyme determined usually by the first "auxotrophy"-gene, which informa-

tion was lost by the first mutation (e. g. *leu*⁻). Thus, the information on the specificity of an enzyme would be stored not only in one single gene but in several genes.

Literatur

BEADLE, G. W.: Chemical Genetics in: Genetics in the 20th Century, 221– 239. New York: Macmillan 1951.

BONNER, D. M.: The genetic unit. Cold Spr. Harb. Symp. quant. Biol. **21**, 163—170 (1956).

BRADLEY, S. G.: Genetic analysis of segregants from heterocaryons of *Streptomyces coelicolor*. J. Bact. **76**, 464—470 (1958).

DEMEREK, M., P. E. HARTMAN, H. MOSER, D. KANAZIR, Z. E. DEMEREK, P. L. FITZGERALD, S. W. GLOVER, E. L. LAHR, W. E. WESTOVER and T. YURA: Bacterial Genetics I. Carnegie Inst. Wash. Yearbook **54**, 219—230 (1955) und folgende Bände.

JINO, T., and J. LEDERBERG: An analysis of monophasic variants of *Salmonella*. Genetics **42**, 378 (1957).

KAPLAN, R. W.: Studien über die UV-Mutabilität verschiedener Stämme von *Serratia* und über die Natur der Färbungsmutationen. Arch. Mikrobiol. **32**, 138—160 (1959).

KOHIYAMA, M., and Y. IKEDA: Anomalous genetic interactions observed in *Bacillus subtilis*. Nature (Lond.) **184**, 208—209 (1959).

LEDERBERG, J., and T. JINO: Phase variation in *Salmonella*. Genetics **41**, 743—757 (1956).

McFALL, E., A. B. PARDEE and G. S. STENT: Effects of radiophosphorus decay on some synthetic capacities of bacteria. Biochim. biophys. Acta **27**, 282—297 (1958).

RYAN, F. J.: Unveröffentlichtes Labormanual „Microbial genetics“. Das Mischungsschema wurde von K. C. ATWOOD entworfen. Für 10 Stoffe A . . . K in 5 Lösungen lautet es z. B.

1:	A	B	C	D
2:	B	E	F	G
3:	C	F	H	J
4:	D	G	J	K
5:	A	E	H	K

Prof. Dr. phil. R. W. KAPLAN, Institut für Mikrobiologie der Johann Wolfgang Goethe-Universität, Frankfurt a. M., Siesmayerstr. 70

AN ANALYSIS OF NON-RECIPROCAL CROSS INCOMPATIBILITY IN *MORMONIELLA VITRIPENNIS* (WALKER)

By

GEORGE B. SAUL 2nd*

With 1 Figure in the Text

(Received December 30, 1960)

Introduction

Examples of maternally transmitted traits have been found among many groups of organisms, and are dependent on widely differing genetic and physiological mechanisms. Such traits, inherited primarily through the egg, appear to be under the control of cytoplasmic particles: these particles may in turn, however, be affected by chromosomal genes. Among plants, the "albomaculatus" type of leaf variegation is an outstanding example of a trait dependent on the segregation of cytoplasmic particles (CORRENS 1937; MICHAELIS 1958); in some species the effect of known genes on cytoplasmic elements has been clearly demonstrated (review by RHOADES 1946).

Various types of cytoplasmic particles are also known to control traits in animals. Hypersensitivity to CO₂ in *Drosophila* is caused by infectious virus-like particles which can pass from a female to her eggs (L'HÉRITIER 1955); the "killer" trait in *Paramecium aurelia* has been shown to be due to cytoplasmic particles of a symbiotic nature and dependent on a specific nuclear gene for their maintenance (SONNEBORN 1955).

The "sex-ratio" condition in *Drosophila willistoni* appears to be cytoplasmically inherited (MALOGOLOWKIN and POULSON 1957), and MALOGOLOWKIN (1957) has obtained evidence of reversals which imply an influence of chromosomal genes. In *Drosophila prosaltans* on the other hand, the "sex-ratio" condition has been shown to be due to an cytoplasmic factor which depends on a dominant nuclear gene for its reproduction (CAVALCANTI et. al. 1957); the similarity of this case to be "killer" trait in *Paramecium* is evident. The comprehensive studies by LAVEN (1957) show that in crosses of certain strains of *Culex pipiens*, a cross in one direction is fully fertile whereas the reciprocal cross is sterile, resulting in many dead embryos. This non-reciprocal sterility, or incompatibility, is believed to be caused by cytoplasmic agents; it is not known to what extent these are controlled by chromosomal genes.

A situation resembling that studied by LAVEN has been found in the parasitic wasp *Mormoniella vitripennis* (Walker). It was observed that in two stocks carrying eye color mutations, mutant males would cross successfully with wild type females, but the reciprocal crosses rarely produced biparental progeny. This

* This study was supported by a research grant from the National Institutes of Health. Part of the work was completed at the Zoologisch-Vergleichendes Anatomisches Institut of the Universität Zürich while the author was a Science Faculty Fellow of the National Science Foundation.

article reports the results of breeding experiments designed to clarify the mode of inheritance of these incompatibilities and to compare the types found in the two stocks.

Material and Stocks

Mormoniella is a Hymenopteron parasitic on the pupae of various muscoid Diptera. Females are diploid, developing from fertilized eggs, whereas males are haploid, arising parthenogenetically from unfertilized eggs. About 85% of the progeny of mated females are female, but all progeny of virgin females are male. Eggs are laid on the surface of the host pupa, under the puparium; the larvae consume the soft parts of the host and pupate within the host puparium. A heavy parasitism leaves only dried remnants of the host. Any developmental stage of *Mormoniella* can be studied by opening the host puparium and removing specimens from the surface of the fly pupa. Details of the life cycle are reviewed by WHITING (1955).

The wild type *Mormoniella* has reddish-brown eyes and an iridescent yellow-green body color; the colors of both eyes and body are darker in females than in males. Wild type stocks have been obtained from Baltimore, Maryland; Woods Hole, Massachusetts; and Ithaca, New York. These are phenotypically identical and have been crossed in all combinations, with no evidence of sterility or abnormally large numbers of dead embryos among the progeny.

The work of P. W. WHITING and his students has resulted in the accumulation of many mutants at the complex R-locus. This locus includes at least six sites, or factors, each factor containing one or more mutations differing from the wild type (WHITING and CASPARI 1957; WHITING and BUSH 1959). Mutations at different factors are complementary to each other, females containing two such mutations being phenotypically wild type; mutations at a common site give a mutant phenotype in compounds. Four of the known R-locus factors contain genes which affect eye color; the others contain mutant genes which cause female sterility and male lethality. There is little or no crossing over within the locus, but some mutations affect two or more factors.

Two of the R-locus mutations which behave as recessives in at least two factors (O and S) are called *R^{pe} 333-5* and *R^{pe} 277* (WHITING 1958). For simplicity, these will be referred to as *pe* and *ti* in this report, and the wild type gene, *R⁺* will be designated *+*. Each mutant gene causes an oyster-grey eye color with a light tinge of red pigment; this tinge is slightly more intense in *pe* (*pe*) individuals than in *tinged* (*ti*) ones. The original mutations arose spontaneously and independently of each other; each has been maintained in stock by the author since 1954 without outcrossing. Both mutant types are highly fertile and viable.

In 1956, it was noticed that crosses of *pe/pe* × *+* gave decreasing percentages of female progeny over a period of several months. The reciprocal cross, *+/+* × *pe*, continued to yield the normal 75–85% female progeny. At about the same time, Miss PATRICIA WEBER, at the University of Pennsylvania, observed that crosses of *ti/ti* × *+* yielded no *F₁* females, whereas *+/+* × *ti* gave normal percentages of female progeny. Stocks of *tinged* maintained by the author, however, did not show this incompatibility with wild type.

Data and Interpretation

Fig. 1 shows the results of reciprocal crosses between *pe* and *+*, *ti* and *+*, and *pe* and *ti*. Each *P₁* cross was made three times, and each set of percentages is based on combined data totalling at least 1000 wasps for each generation. Percentages of females shown in the Figure are approximations, based on the data shown in the Table.

The data show that a) incompatibility between *pe* and *+* is incomplete, *pe/pe* × *+* yielding about 8% female progeny (Fig. 1, aI), whereas incompatibility between *ti* and *+* is complete, *ti/ti* × *+* yielding no female progeny (Fig. 1, c); b) the incompatibility occurs only when the parental females are drawn from the mutant stocks (Fig. 1, b and d, I–III); c) the incompatibility between

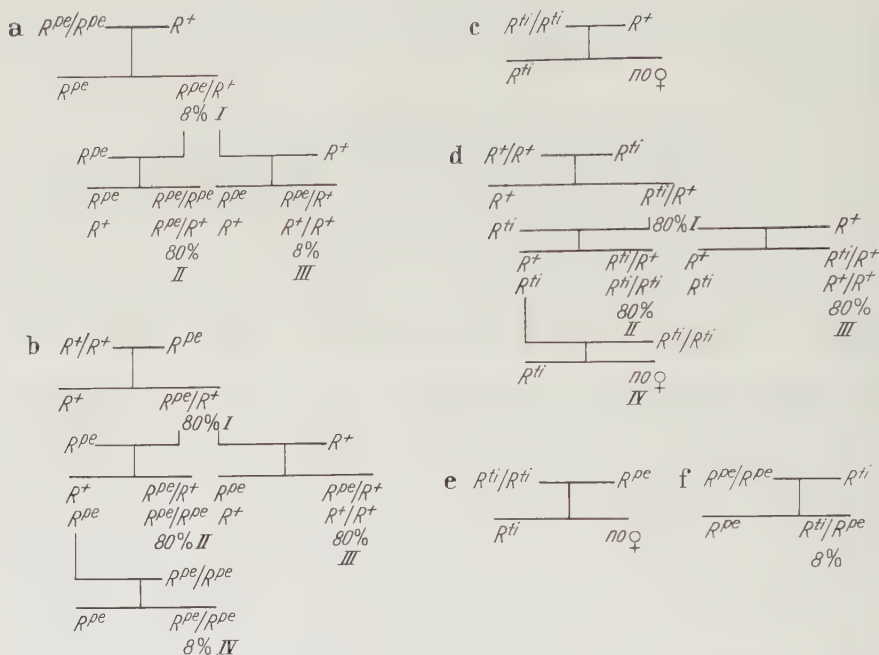


Fig. 1a—c. Results of reciprocal crosses between R^{pe} and R^+ , R^{ti} and R^+ , and R^{pe} and R^{ti} stocks. Each P_1 cross was made times; percentages are based on combined data from these crosses. A total of at least 1000 individuals was obtained in each generation shown. Haploid males are characterized by one gene symbol, whereas two gene symbols denote the diploid females. Actual percentages of females, approximated here by 80% and 8%, are given in the Table

Table. Data obtained from crosses of pe and ti with each other, and with wild type.

Cross and culture series numbers refer to Fig. 1; 1a III, for example refers to the progeny of R^{pe}/R^+ in cross 1a and includes the females denoted III. Data are pooled from at least three repetitions of each cross.

Cross and Culture Series	Number of progeny (Males and Females in series)	Number of Females in series	Percentage of Females
1a I	1420	116	8.2
II	1085	905	83.4
III	1125	89	7.9
1b I	1535	1214	79.1
II	1239	948	76.7
III	1170	927	79.2
IV	1339	104	7.8
1c	2783	0	0.0
1d I	1349	1059	78.5
II	1490	1195	80.2
III	1152	907	78.7
IV	1042	0	0.0
1e	1478	0	0.0
1f	1182	91	7.7

pe and $+$ is transmitted through the egg, the few F_1 females behaving like pe/pe in crosses (Fig. 1, a II and III); and d) the mechanisms governing the incompatibilities are different in the two stocks, since neither of the crosses between pe and ti yields normal percentages of F_1 females (Fig. 1, e, f); each stock thus behaves as wild type with respect to the other.

F_1 females from the cross of wild type females by $peach$ males were crossed to $peach$ males, to obtain a new stock homozygous for the pe gene (Fig. 1, b); a new tinged stock was similarly obtained from an initial cross of $+/+$ X ti (Fig. 1, d). When males from these new stocks were crossed with females from the corresponding original stocks, the incompatibility reactions were the same as those shown in Fig. 1 for crosses involving wild type males (Fig. 1, b and d, IV). The reciprocal crosses gave normal percentages

of F_1 females. The results indicate that the incompatibility reactions are not directly dependent on the mutant eye color genes in the stocks in which they arose, or on any genes closely linked with the R-locus.

In an attempt to find the type of nuclear control, if any, over the incompatibility, the author conducted the following experiment, suggested by Dr. EDWARD GLASSMAN. Assume that a cytoplasmic factor C causes the death of embryos carrying it and that this death is prevented by homozygosity or hemizygosity of a recessive gene g . The *peach* (or *tinged*) stock would then be gg (C), and the wild type stock could be designated as g^+g^+ . F_1 females from crosses of *peach* or *tinged* males by wild type females are represented as g^+g ; half of the sons of these females are g^+ and half are g , none having C. The critical test of this hypothesis involves crossing the sons to gg (C) females, isolating the females into separate culture vials after mating, and determining whether any produces normal percentages of female progeny, as predicted by the hypothesis.

Since mating of *Mormoniella* is usually successful if groups of four or more males are placed with a similar number of females, but is often unsuccessful if a single male is placed with a single female, a preliminary test was conducted to determine whether in mass matings a female mates more than once. Ten females homozygous for a recessive eye color mutation, R^{stDR} , were placed in a vial with five R^{stDR} and five R^+ males, separated 24 hours later, and set individually. F_1 females in each culture were all $stDR$ or all wild type phenotypically; no culture produced a mixture. A repetition of the experiment gave the same results. All P_1 females produced F_1 females, showing that they had mated, but the absence of two phenotypic classes of F_1 females in any single culture showed that under the conditions of the experiment no P_1 female had mated successfully with both R^+ and R^{stDR} males.

To test the hypothesis, 12 *pe pe* females were crossed with 36 F_2 males from the cross of $++ \times pe$; half of these males are assumed to contain g and the other half to contain g^+ . Similarly, 12 *ti/ti* females were mated with 36 F_2 males from the cross of $++ \times ti$. Each female was isolated in an individual culture vial after 24 hours of the mass mating; 11 of the 12 in each group produced progeny. Only one culture contained female progeny; this, from a *pe/pe* parent female, contained 2 females and 110 males. Since no culture contained the expected 75%—85% female progeny, the test does not support the hypothesis outlined above. One host was removed from each culture 4 days after having been placed in it; examination of these and of the remaining hosts 10 days later (when the parasitizing wasps had pupated) revealed no accumulations of dead embryos.

Discussion

The data presented above suggest that the cases of non-reciprocal cross sterility, or incompatibility, are due to cytoplasmic agents which are transmitted through the egg alone. These agents are of different types in the two stocks, the type in the *tinged* stock being completely effective in preventing production of F_1 females from the cross of *ti/ti* \times $+$ whereas that in the *peach* stock permits a few F_1 females from the cross of *pe/pe* \times $+$. The distinction is further emphasized by the fact that in crosses between the two stocks, each shows the same incompatibility reactions toward the other as it does toward wild type.

Although both incompatibility reactions arose in stocks containing R-locus eye color mutants, and although the eye color mutants are remarkable similar genetically, there is no evidence that either incompatibility is in any way associated with the R-locus. In the absence of such evidence, the appearance of the reactions in such similar stocks cannot yet be related to a common cause.

At present neither the structure, chemical nature, nor mode of action of the cytoplasmic factors is known. The absence of easily discernable masses of dead embryos or of any significant reduction in the number of individuals in female-free cultures suggests that the action of the factors is to prevent fertilization, either through failure of the sperm to enter the egg or through degeneration of the sperm nucleus following entry, rather than to cause the death of the embryo following fertilization. It is necessary to establish this point by egg hatchability counts and to determine whether the factors can be transferred to individuals initially free of them.

Since no comprehensive study has been made of geographically different races of *Mormoniella*, it is not known whether cross incompatibilities exist between established natural populations. It can be speculated, however, that the cases reported here may be of the type which could give rise to the complex types of cross sterility found by LAVEN in his studies of geographically different races of *Culex pipiens*.

Summary

1. Crosses of $R^{pe333.5} R^{pe333.5} \times R^+$ and $R^{i277} R^{i277} \times R^+$ resulted in lowered percentages of biparental (female) progeny, with no reduction in the total numbers of progeny. The reciprocal crosses yielded normal percentages of female progeny.

2. The agents controlling the incompatibility between the $R^{pe333.5}$ and R^+ stocks are different from those controlling the $R^{i277} - R^+$ stock incompatibilities. Neither type appears to be related to the eye color genes in the mutant stocks.

3. The incompatibility between $R^{pe333.5}$ and R^- is transmitted, apparently cytoplasmically, to the much reduced numbers of female progeny of $R^{pe333.5} R^{pe333.5} \times R^+$. The cross of $R^{i277}/R^{i277} \times R^+$ yields no female progeny.

4. No genic control over either case of incompatibility has yet been demonstrated. Evidence is presented in support of the theory that the reduced percentages of F_1 females are due to failure of sperm to fertilize the eggs successfully rather than to death of embryos.

Bibliography

- CAVALCANTI, A. G. L., D. N. FALCAO and L. E. CASTRO: "Sex-ratio" in *Drosophila prosaltans*-a character due to interaction between nuclear genes and cytoplasmic factors. *Amer. Naturalist* **91**, 327—329 (1957).
- CORRENS, C.: Nicht mendelnde Vererbung. *Handbuch der Vererbungslehre*, Bd. 22. 159 pp. Berlin: Borntraeger 1937.
- LAVEN, H.: Vererbung durch Kerngene und das Problem der außerkaryotischen Vererbung bei *Culex pipiens*. II. Außerkaryotische Vererbung. *Z. indukt. Abstamm.- u. Vererb.-Lehre* **88**, 478—516 (1957).
- L'HERITIER, P.: Les virus integres et l' unite cellulaire. *Ann. de Biol.* **31**, 481—496 (1955).
- MALOGOLOWKIN, C.: Maternally inherited "sex-ratio" conditions in *Drosophila willistoni* and *Drosophila paulistorum*. *Genetics* **43**, 274—286 (1957).
- , and D. F. POULSON: Infective transfer of maternally inherited abnormal sex-ratio in *Drosophila willistoni*. *Science* **126** (3262), 32 (1957).

- MICHAELIS, P.: Cytoplasmic inheritance and the segregation of plasmagenes. Proc. X Internat. Congr. of Genetics 1959, vol. 1, pp. 375—385.
- RHOADES, M. M.: Plastid mutations. Cold Spr. Harb. Symp. quant. Biol. 11, 202—207 (1946).
- SONNEBORN, T. M.: Heredity, development, and evolution in *Paramecium*. Nature (Lond.) 175, 1100 (1955).
- WHITING, P. W.: A parasitic wasp and its host for genetics instruction and for biology courses. Carolina Tips 18, 13—16 (1955).
- *Mormoniella* and the nature of the gene: *Mormoniella vitripennis* (WALKER) (Hymenoptera: Pteromalidae). Proc. X Internat. Congr. of Entomology 1958, vol. 2, pp. 857—866.
- , and D. J. BUSH: Maintaining stocks in *Mormoniella*. Proc. Penna. Acad. Sci. 33, 248 to 251 (1959).
- , and S. B. CASPARI: *Mormoniella* merry-go-rounds. J. Hered. 48 (1), 31—35 (1957).

Dr. GEORGE B. SAUL 2nd,
Department of Zoology, Dartmouth College, Hanover, New Hampshire USA

Institut für Strahlenbiologie, Kernforschungszentrum Karlsruhe

ZUR SAUERSTOFFABHÄNGIGKEIT DER RATE STRAHLEN-
INDUZIERTER CHROMOSOMENABERRATIONEN IN OOZYTEN
VON *DROSOPHILA MELANOGASTER*

Von

H. WIND und H. TRAUT

Mit 1 Textabbildung

(Eingegangen am 21. Januar 1961)

ABRAHAMSON (1956, 1959) untersuchte die Sauerstoffabhängigkeit der röntgen-induzierten Chromosomenaberrationsrate in *Drosophila*-Oozyten und fand neben Ergebnissen, die die allgemeine Vorstellung vom „Sauerstoffeffekt“ bestätigen, einen „inversen“ Sauerstoffeffekt: Anwesenheit von Stickstoff nach konzentriert verabreichter Dosis oder zwischen zwei Dosisfraktionen *vergrößert* die Chromosomenaberrationsrate gegenüber der durch konzentrierte Bestrahlung in Luft ausgelösten, im Intervall gebotener Sauerstoff *verkleinert* sie. Diese Befunde erscheinen, vor allem im Zusammenhang mit ähnlichen an pflanzlichen Objekten gewonnenen Resultaten (WOLFF und ATWOOD 1954; WOLFF und LUTHPOLD 1955, 1956a, b, 1958; BEATTY et al. 1956) von großem Interesse, so daß wir eine Reproduzierung für angebracht hielten. Da sich hierbei zwei neue Hinweise ergeben haben, sollen unsere Daten im folgenden kurz mitgeteilt werden.

Unsere Kreuzungs- und Bestrahlungsanordnung stimmt prinzipiell mit der von ABRAHAMSON (1959) verwendeten überein. Den mittels „snoc“-Technik¹ registrierten sog. Halbtranslokationen liegen Zweibruchereignisse zugrunde, die eine Trennung des attached-X-Verbandes zur Folge haben und sich dadurch in der F_1 der bestrahlten ♀♀ manifestieren. Wie ABRAHAMSON (1959) bezogen wir die Aberrationshäufigkeiten auf die vom 1. bis 4. Tag nach der Bestrahlung abgelegten Eier, ermittelten sie jedoch *getrennt* für den 1. und 2. Tag (Brut A) und 3. und 4. Tag (Brut B), um eine eventuelle Reifegradabhängigkeit zu berücksichtigen. (Vgl. auch die Untersuchungen von PARKER und HAMMOND 1958 an stage 7- und stage 14-Oozyten.) Die im Alter von 3—6 Tagen bestrahlten „snoc“-♀♀ (mit $y^+ sc^{r1} \cdot Y^N$) wurden mit $y sc^{r1} B In 49 r f \delta \delta$ angesetzt (2 Pärchen pro Glas). Die Bestrahlungsdosis betrug stets 2000 r; sie wurde entweder in 1 min oder in 1000 r-Fraktionen in je $\frac{1}{2}$ min mit 1stündigem Intervall appliziert. Die Vor- bzw. Nachbehandlung dauerte 1 Stunde. Bestrahlungsbedingungen: 150 kV Röhrenspannung, 20 mA Stromstärke, 6 mm Al HWS. Die Entfernung von Sauerstoffspuren aus dem Stickstoff geschah durch „O₂-Multi-rapid“². Alles weitere geht aus Abb. 1 hervor.

Die verschiedenen Behandlungsweisen sind aus der Tabelle ersichtlich, die unsere Ergebnisse zusammen mit denen von ABRAHAMSON (1959) wiedergibt.

¹ Herrn Dr. I. OSTER (Philadelphia) danken wir für die Übersendung der erforderlichen Stämme.

² Union Apparatebaugesellschaft Karlsruhe.

ABRAHAMSONs Werte können dabei etwas von den realen Versuchsdaten abweichen, da sie als „standard weighted frequencies“ auf die jeweiligen Kontrollwerte (2000 r konzentriert, in Luft) bezogen sind gemäß einem von MULLER (1941) angegebenen statistischen Verfahren („harmonic mean method“). Hieraus dürfte sich auch die fehlende Angabe einer Rate für Serie 1 (Tabelle) erklären.

Wie die Tabelle zeigt, konnten wir ABRAHAMSONs Befunde weitgehend bestätigen. Die sich aus der vergleichenden Betrachtung der verschiedenen Serien ergebenden Schlußfolgerungen sind bereits bei ABRAHAMSON (1959) diskutiert. Wir wollen uns daher darauf beschränken, zwei neue Gesichtspunkte hervorzuheben, die sich bei unseren Versuchen ergeben haben: 1. Die Raten der meisten Serien tendieren dazu, in Brut B (3. und 4. Tag) gegenüber Brut A (1. und 2. Tag) abzusinken; die Unterschiede sind in den Serien 6 und 10 durch $P \leq 0,05$, in den Serien 5 und 11 durch $P < 0,01$ gesichert. Somit besteht bereits bei Oozyten des 1. bis 4. Tages gegenüber den verschiedenen Behandlungsweisen eine mehr oder weniger stark ausgeprägte Reifegradabhängigkeit. 2. ABRAHAMSON betont, daß er keinen Einfluß der Stickstoffvorbehandlung auf die Halbtranslokationsrate feststellen konnte („... nor pretreatment with nitrogen [series 6] produce any significant alteration of the rearrangement frequency when compared with the concentrated air treatment ...“). Dies ist unserer Meinung nach darauf zurückzuführen, daß bei dem erwähnten von ABRAHAMSON angewandten statistischen Verfahren zur Prüfung von Unterschieden der betreffende Kontrollwert besonders stark berücksichtigt wird, dieser im Falle der Stickstoffvorbehandlung — wohl zufällig — besonders hoch war (4,5%) und dadurch ein an sich existierender Unterschied verwischt wurde. Da bei unseren Versuchen die Prüfung auf Heterogenität in den einzelnen Serien stets negativ ausgefallen war, sehen wir keinen Grund, von der üblichen χ^2 -Methode zur Prüfung von Unterschieden abzusehen. Vergleichen wir nun Serie 6 (Stickstoffvorbehandlung) mit Serie 1 (konzentrierte Bestrahlung in Luft), so ergibt sich eine signifikante Erhöhung der Aberrationshäufigkeit ($P < 10^{-4}$ für Brut A, $P < 10^{-6}$ für Brut B) und außerdem gute Übereinstimmung mit Serie 2 (Bestrahlung in Sauerstoff; $P = 0,16$ für Brut A, $P = 0,86$ für Brut B).

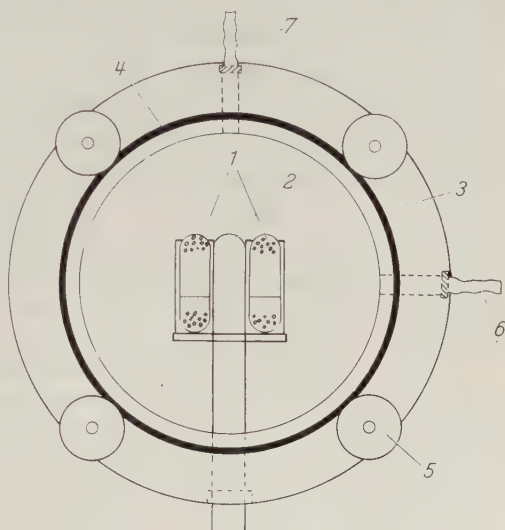


Abb. 1. Die bei unseren Untersuchungen verwendete Bestrahlungsanordnung (Aufsicht, leicht schematisiert). Die Fliegen befinden sich in perforierten Gelatine-kapseln 1, diese mit dem Dosimeter 2 (Schlauchionisationskammer; gasdicht zur Verhinderung von Diffusion) in einer aus Plexiglas gefertigten Kammer (äußere Abmessungen: 2,5 cm hoch, 8 cm Durchmesser), die bei Bestrahlungen in N_2 oder O_2 oben mit einer Zellophanfolie verschlossen wird. Hierzu Deckelring 3, Gumdichtung 4, Rändelmuttern 5, Gaseinlaß- und -auslaßstutzen 6, 7. Ein Teil der Bestrahlungen wurde in einer im Vergleich zur dargestellten leicht modifizierten Kammer durchgeführt

Beim Versuch einer Deutung dieses Effekts wäre einmal daran zu denken, daß die Stickstoffvorbehandlung zu einer Atmungshemmung in den Oozyten führen könnte, die eine während der Bestrahlung wirksam werdende Anreicherung von (nicht veratmetem) Sauerstoff und somit Strahlensensibilisierung zur Folge hätte. Hierzu würde gut die erwähnte Übereinstimmung unserer Stickstoffvorbehandlungswerte mit den bei Bestrahlung in Sauerstoff erzielten Raten passen. SOBELS (1960) erwägt unter anderem dieses Prinzip der Atmungshemmung zur Interpretierung seiner Vorbehandlungsversuche mit Cyanid, die eine Erhöhung der strahleninduzierten Rate rezessiv geschlechtsgebundener Letalfaktoren in Spermatiden von *Drosophila* ergaben.

Andererseits bzw. ergänzend ließe sich vermuten, daß mit der Hemmung des Atmungssystems eine verringerte ATP-Produktion verbunden wäre. Da WOLFF und LUIPPOLD (1955, 1956, 1958) durch Untersuchungen an *Vicia* und

Tabelle

Serie	Versuchsanordnung			Eigene Ergebnisse			ABRAHAMSON (1959)
	Bestrah- lung	Intervall, bzw. Vor- od. Nach- behandl.	Bestrah- lung	Brut A (1.—2. Tag)	Brut B (3.—4. Tag)	Unter- schied A/B (P)	1.—4.Tag
1	2000 r Luft	—	—	2,8% (64/2316)	2,2% (135/6162)	0,14	s. Erläute- rung im Text (1271/38273)
2	2000 r O ₂	—	—	4,3% (43/1003)	4,0% (95/2383)	0,76	4,6% (439/9474)
3	2000 r N ₂	—	—	1,0% (25/2626)	0,6% (55/8585)	0,13	0,6% (39/6222)
4	2000 r Luft	O ₂	—	nicht untersucht		—	3,1% (187/5994)
5	2000 r Luft	N ₂	—	4,8% (102/2103)	2,8% (156/5481)	< 10 ⁻⁴	5,3% (210/3981)
6	—	N ₂	2000 r Luft	5,8% (56/961)	4,1% (108/2621)	0,04	5,3% (64/1216)
7	1000 r O ₂	Luft	1000 r O ₂	2,0% (9/447)	2,5% (43/1694)	0,64	2,6% (211/8227)
8	1000 r N ₂	Luft	1000 r N ₂	0,9% (7/788)	0,5% (11/2291)	0,31	0,8% (106/12344)
9	1000 r Luft	Luft	1000 r Luft	2,4% (18/740)	1,8% (33/1863)	0,34	2,0% (450/25110)
10	1000 r Luft	O ₂	1000 r Luft	2,9% (16/546)	1,4% (17/1198)	0,05	2,3% (377/16600)
11	1000 r Luft	N ₂	1000 r Luft	4,2% (62/1478)	2,8% (191/6716)	0,009	4,8% (388/8131)
12	Spontanrate			0,0% (0/216)	0,2% (2/1056)	0,76	0,03% (9/27358)

Tradescantia eine Beteiligung des ATP bei der Restitution und Rekombination von Chromosomenbrüchen wahrscheinlich gemacht haben, blieben diese bei ATP-Mangel länger offen, die Wahrscheinlichkeit der Bildung einer Aberration an-

stelle Restitution nähme zu, und eine erhöhte Halbtranslokationsrate wäre die Folge. Auf diese Weise deutet auch SOBELS (1960) die von ihm erzielte Erhöhung der Translokationsrate in *Drosophila*-Spermatiden durch Cyanidnachbehandlung; hierbei wäre die ATP-Synthese durch Cyanidwirkung herabgesetzt.

Summary

ABRAHAMSON's (1959) results concerning the influence of oxygen on the frequency of X-ray induced structural changes (half-translocations) in *Drosophila* oocytes were generally reproduced, especially the demonstration of a "reverse" oxygen effect (under special experimental conditions protecting action of oxygen, sensitization by nitrogen). In the course of our investigations the following new findings were obtained: 1. The added aberration frequencies of the 3rd and 4th day after the various treatments generally tend to decrease as compared with those of the first two days (dependence on state of maturity of the treated oocytes). 2. Preirradiation treatment by nitrogen increases the aberration frequency significantly. Possible explanations of this effect are discussed.

Eine ausführlichere Darstellung der Ergebnisse erfolgt in der Diplomarbeit von H. WIND.

Literatur

- ABRAHAMSON, S.: The effects on rearrangement frequency of different oxygen tensions either during or between fractionated X-ray treatments of *Drosophila* oocytes. *Rec. Genet. Soc. Amer.* **25** (1956). — *Genetics* **41**, 631 (1956) (Abstr.).
- The influence of oxygen on the X-ray induction of structural changes in *Drosophila* oocytes. *Genetics* **44**, 173—185 (1959).
- BEATTY, A. V., J. W. BEATTY and C. COLLINS: Effects of various intensities of X-radiation on chromosomal aberrations. *Amer. J. Bot.* **43**, 328—332 (1956).
- MULLER, H. J.: On judging the significance of a difference obtained by averaging essentially different series. *Amer. Naturalist* **65**, 264—271 (1941).
- PARKER, D. R., and A. E. HAMMOND: The production of translocations in *Drosophila* oocytes. *Genetics* **43**, 92—100 (1958).
- SOBELS, F. H.: Chemical steps involved in the production of mutations and chromosome aberrations by X-irradiation in *Drosophila*. I. The effect of post-treatment with cyanide in relation to dose-rate and oxygen tension. *Int. J. Rad. Biol.* **2**, 68—90 (1960).
- WOLFF, S., and K. C. ATWOOD: Independent X-ray effects on chromosome breakage and reunion. *Proc. nat. Acad. Sci. (Wash.)* **40**, 188—192 (1954).
- , and H. E. LUTPOLD: Metabolism and chromosome-break rejoining. *Science* **122**, 231—232 (1955).
- — The biochemical aspects of chromosome rejoining. *Progress in Radiobiology*. Edit. by J. S. MITCHELL, B. E. HOLMES and C. L. SMITH. Edinburgh: Oliver & Boyd (1956a).
- — The production of two chemically different types of chromosome breaks by ionizing radiations. *Proc. nat. Acad. Sci. (Wash.)* **42**, 510—514 (1956b).
- — Modification of chromosomal aberration yield by postirradiation treatment. *Genetics* **43**, 493—501 (1958).

Dr. H. TRAUT und cand. rer. nat. H. WIND,
Institut für Strahlenbiologie, Kernforschungszentrum Karlsruhe,
Karlsruhe (Postfach)

Department of Zoology, Columbia University, New York, N.Y.

IS DNA REPLICATION A NECESSARY CONDITION FOR SPONTANEOUS MUTATION? * **

By

FRANCIS J. RYAN, DAISUKE NAKADA and MARLA J. SCHNEIDER ***

With 2 Figures in the Text

(Received January 26, 1961)

Previous communications from our laboratory have described a spontaneous mutation from a histidineless (h^-) to a histidine independent (h^+) condition in non-dividing *Escherichia coli* 15 during histidine starvation (RYAN 1959). Since then the possibility has been considered that errors may arise during DNA replication within these non-dividing cells.

DNA is thought to be formed by replication. MESELSON and STAHL (1958) have used a density gradient centrifugation technique to show that bacterial DNA is bipartite as was proposed by WATSON and CRICK (1953) and that it reproduces in a semi-conservative fashion (DELBRÜCK and STENT 1957), each original sub-unit being found associated, upon replication, with a newly-formed sub-unit.

NAKADA and RYAN (1961), who employed *E. coli* inhibited by chloramphenicol, showed that this is also the case in non-dividing bacterial cells while they engage in a residual DNA synthesis that lasts a few hours. Therefore an attempt was made to determine whether DNA replicates in non-dividing bacteria under conditions allowing mutation.

A double auxotroph of *E. coli* 15 $h^- l^-$ (histidine- and leucine less) was starved for amino acids in minimal medium. The $h^+ l^-$ or $h^- l^+$ mutants, pre-existing or occurring spontaneously during starvation, could not overgrow because they lacked leucine or histidine. In this system large enough numbers of bacteria (ca. 10^9 per ml) can be collected for the measurement of macromolecules.

In the very early period of starvation for both histidine and leucine, there was up to a 35 per cent increase of DNA (Fig. 1). This is in good agreement with the finding of GOLDSTEIN, GOLDSTEIN, BROWN and CHOU (1959) who observed a residual synthesis of DNA in an *E. coli* K-12 *leucineless* mutant starved for leucine. But this residual synthesis ceased after 5 hours of starvation and the amount of DNA decreased gradually. After 100 hours of starvation, the amount of DNA was about the same as that at zero time. The number of mutants expected as a consequence of this residual synthesis of DNA was too small to be detected under the conditions of this experiment, on the assumption

* Wir widmen diese Arbeit in Verehrung Herrn Prof. Dr. FRANZ SCHRADER zu seinem 70. Geburtstage.

** This work was supported, in part, by grants from the American Cancer Society, the National Science Foundation and the United States Public Health Service.

*** Public Health Service Training Fellow.

that they occurred at the rate of 3×10^{-8} per bacterium per generation which is characteristic of growing bacteria. But the number of h^+ mutants was observed to increase gradually even during the period when no DNA synthesis was occurring.

Occasionally, in similar systems, the increase of DNA in the early period of starvation was not observed. Residual synthesis of DNA may depend on the conditions of previous culture. What is important here is the fact that mutation seems to take place while DNA is not being synthesized.

Therefore, the possibility was considered that a molecular turnover of DNA might be responsible for the mutations occurring when no net synthesis of DNA is observed. This question was investigated by density gradient centrifugation of bacterial DNA labeled with N^{14} and N^{15} according to the procedure of MESELSON and STAHL (1958).

E. coli 15 h^- was brought to a stationary phase of about 2×10^7 cells per ml after 72 hours incubation at 20°C in a GRAY and TATUM's medium (RYAN 1959) which contained 100 mg $N^{15}H_4Cl$ per ml as the sole source of nitrogen together with limiting amounts of glucose (7.5 mg per ml) and L-histidine (0.1 mg per ml). Two thousand tubes were employed each containing 2 ml of such cultures. After the histidine was exhausted starvation started at 20°C and $N^{14}H_4Cl$ (1 mg per ml),

lactose (0.05 per cent), and 20 μg per ml each of deoxyribonucleosides, deoxyribonucleotides, ribonucleosides and ribonucleotides were added. During 429 hours of starvation, mutation to h^+ took place at a constant rate. Turbid tubes which showed overgrowth because of pre-existing h^+ mutants could be distinguished from those containing h^+ mutants that rose later during the starvation (Fig. 2). At 429 hours the unturbid cultures were pooled, their cells were collected by centrifugation and a bacterial lysate was made. Density gradient centrifugations were performed in a $CsCl$ solution (density 1.71 g cm^{-3}) and ultra-violet absorption photographs were taken after 20 hours at $140,000 \times G$ (44,770 r. p. m.) in a Spinco E ultracentrifuge. On the photographs only N^{15} -DNA

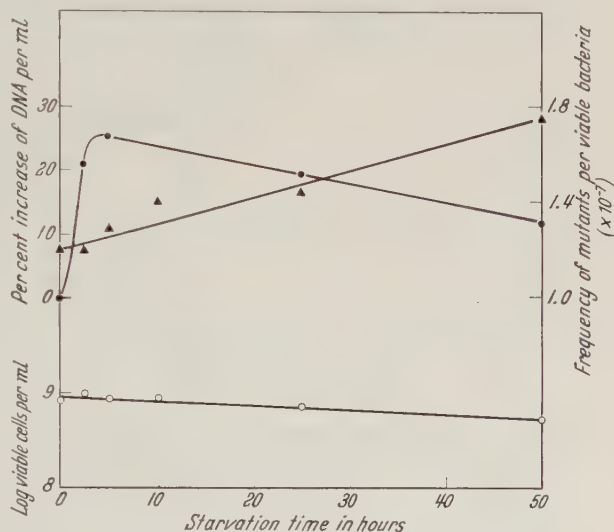


Fig. 1. The behavior of *E. coli* 15 h^- during a stationary phase (brought about by starving the cells for both histidine and leucine) in lactose (0.1 per cent) at 37°C with shaking. The closed circles represent the per cent increase or decrease of DNA per ml relative to time zero. The viability of the culture is indicated by the open circles, while the frequency of h^+ revertants per bacterium is represented by triangles. The $h^+ h^-$ mutant number was determined at different times either by direct plating on minimal medium containing leucine but not histidine, or by fractionating a sample of the culture into medium containing leucine but not histidine. In the latter case the average number of mutants was calculated from the frequency of cultures without $h^+ h^-$ overgrowths and the zero term of the Poisson equation (see RYAN 1955). Points represent an average of from 2 to 3 determinations

bands could be observed and no evidence was obtained for N^{15} — N^{14} hybrid DNA bands nor N^{14} —DNA bands. The identification of the N^{15} —DNA bands was verified by the observation of only the same single bands at the density level of 1.72 even when N^{15} —DNA had been added to the experimental lysates.

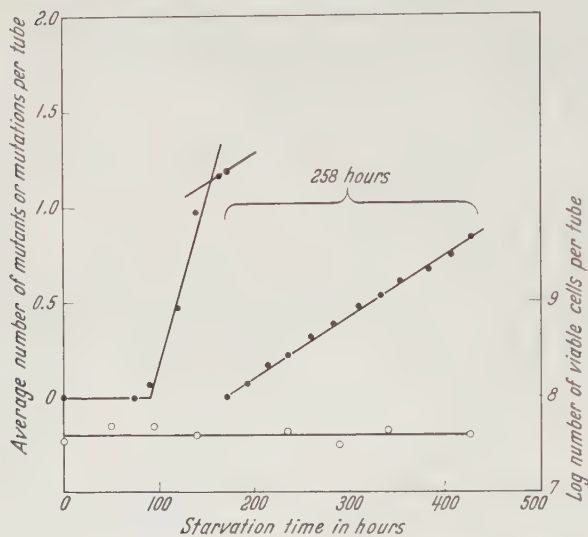


Fig. 2. The continued appearance of h^+ mutants among h^- cultures of *E. coli* 15 during histidine starvation. The N^{15} -labeled bacteria were brought to a stationary phase by the exhaustion of histidine, and at time zero, $N^{14}H_4Cl$ and lactose together with N^{14} -deoxyribo- and ribo-nucleosides and nucleotides were added. The number of cultures made turbid by the overgrowth of h^+ bacteria was observed from time to time. The fraction of unturbid cultures and the zero term of the Poisson equation were used to calculate either the average number of pre-existing mutants or the average number of mutations per tube. The left hand curve following the closed circles inflects at a time when preexisting h^+ mutants have overgrown. Thereafter, unturbid cultures become turbid due to the occurrence of mutations in the non-dividing bacteria they contain. The rate of this mutation was 6.9×10^{-11} per bacterium per hour (see RYAN 1955). The lower curve represents the average number of viable bacteria per tube

that cell-turnover does not occur among even a small fraction of the starved bacteria (RYAN 1959). The fact that only an N^{15} —DNA band was observed after starvation rules out the possibility of a turnover of whole molecules of DNA. This is consistent with the usual finding that, although RNA and protein do turnover, DNA does not (see FRESCO and BENDICH 1960).

On the other hand, in this laboratory evidence has been accumulated suggesting that DNA replication is a necessary condition for base analogue-induced mutation particularly in studies of *Salmonella typhimurium* the induction by 2-amino purine and 5-bromouracil of mutations detectable by plating requires the incorporation of the base analogue while the DNA is replicating (RUDNER 1960 and NAKADA, STRELZOFF, RUDNER and RYAN 1960).

If FREESE's model of mutation (1959) is generally acceptable, and if the mutational events under study are restricted to DNA, we can understand spontaneous mutation on the following hypotheses:

If the mutations observed occurred as errors during a slow replication of DNA in the non-dividing cells with the same chance with which they occur during growth, a net increase in DNA of 50 per cent should have been observed. In a parallel experiment, the amount of DNA per ml of unturbid cultures were estimated. There was no residual synthesis of DNA during the early period of starvation, and at 383 hours there was even a 15 per cent decrease. Furthermore since at least 5 per cent N^{15} — N^{14} DNA could have been detected and none was observed, and since two-thirds of the total DNA should have been hybrid, less than 7 per cent of the replication required to give rise to the mutations could have taken place.

The absence of hybrid DNA is further evidence

1. A minute amount of DNA replicates but base-pairing errors occur with an unusually high frequency, because, say, of some change in the composition of the nucleotide pool.

2. Minor and selective base-substitution in DNA takes place during starvation; in this way an unusual base may be incorporated into DNA, or a normal base may be incorporated into an unusual site in the DNA molecules.

These hypotheses are now under investigation by the use of radioactive bases and mutagenic base analogues.

Acknowledgement. The authors are indebted to Prof. C. O. BECKMANN of the Department of Chemistry, Columbia University for his help with a Spinco E ultracentrifuge.

References

- DELBRÜCK, M., and G. S. STENT: On the mechanism of DNA replication. In: The chemical basis of heredity, p. 699, edit. W. D. McELROY and H. B. GLASS. Baltimore: Johns Hopkins Press 1957.
- FRESE, E.: The difference between spontaneous and base-analogue induced mutations of phage T 4. Proc. nat. Acad. Sci. (Wash.) **45**, 622 (1959).
- FRESCO, J. R., and A. BENDICH: The metabolic stability of rat liver deoxyribonucleic acid: a turnover study. J. biol. Chem. **235**, 1124 (1960).
- GOLDSTEIN, A., D. B. GOLDSTEIN, B. J. BROWN and S.-C. CHOU: Amino acid starvation in an *Escherichia coli* auxotroph. I. Effects on protein and nucleic acid synthesis and on cell division. Biochim. biophys. Acta **36**, 172 (1959).
- MESELSON, M., and F. W. STAHL: The replication of DNA in *E. coli*. Proc. nat. Acad. Sci. (Wash.) **44**, 671 (1958).
- NAKADA, D., and F. J. RYAN: Replication of DNA in non-dividing bacteria. Nature (Lond.) **189**, 398 (1961).
- E. STRELZOFF, R. RUDNER and F. J. RYAN: Is DNA replication a necessary condition for mutation? Z. Vererb.-Lehre **91**, 210 (1960).
- RUDNER, R.: Mutation as an error in base pairing. Biochem. biophys. Res. Commun. **3**, 275 (1960).
- RYAN, F. J.: Spontaneous mutation in non-dividing bacteria. Genetics **40**, 726 (1955).
- Bacterial mutation in a stationary phase and the question of cell turnover. J. gen. Microbiol. **21**, 530 (1959).
- WATSON, J. D., and F. H. C. CRICK: The structure of DNA. Cold Spr. Harb. Symp. quant. Biol. **18**, 123 (1953).

Prof. Dr. F. J. RYAN,
Dept. of Zoology, Columbia University in the City of New York,
New York 27 (U.S.A.)

Aus dem Zoologisch-vergl. anatomischen Institut der Universität Zürich

EXPERIMENTELLE UNTERSUCHUNGEN ÜBER DEN HARNSÄURE-
STOFFWECHSEL BEI VERSCHIEDENEN GENOTYPEN
VON *DROSOPHILA MELANOGASTER*

Von

PAUL AUF DER MAUR

Mit 13 Textabbildungen

(Eingegangen am 28. Januar 1961)

I. Einleitung

Bei Augenfarbmutanten von Insekten zeigt sich das Phänomen der biochemischen Pleiotropie (vgl. HADORN 1954a, 1959). Dies äußert sich unter anderem in charakteristischen Unterschieden im Inventar der Pterine und anderer fluoreszierender Stoffe. Dabei unterscheiden sich die verschiedenen Genotypen sowohl im organspezifischen Verteilungsmuster der genbedingten Pterine wie auch im zeitlichen Auftreten und Verschwinden dieser Stoffe während der Entwicklung. So konnte HADORN (1954b) für die *white*-Mutante von *Drosophila melanogaster* zeigen, daß sich der Isoxanthopteringehalt im Verlaufe der Puppenzeit ähnlich wie beim Wildtyp erhöht. Nach dem Schlüpfen nimmt der Gehalt bei *white* rasch ab, so daß sich bei 4 Tage alten Imagines kein Isoxanthopterin mehr nachweisen läßt, während es im Wildtyp zeitlebens nachweisbar bleibt. Gleichzeitig verschwinden bei *white* auch die anderen fluoreszierenden Stoffe aus dem Körper. Dieser Abfall läßt sich teilweise dadurch erklären, daß bei *white* in den Erst-Exkreten des Meconiums total mehr fluoreszierende Stoffe ausgeschieden werden als bei Wildfliegen (HADORN und KÜRSTEINER 1955).

Da zwischen Pterinen und Purinen biochemische Beziehungen bestehen (vgl. ALBERT 1957), schien es von Interesse, den Purinstoffwechsel von *Drosophila* im Zusammenhang mit den Pterinen zu untersuchen. Endprodukt des Purinstoffwechsels und Hauptexkretionsprodukt bei Insekten ist meist Harnsäure (HEIDERMANNS 1938, WIGGLESWORTH 1942, BALDWIN 1957). Neben Harnsäure kommen allerdings auch andere Exkretstoffe vor. So scheiden die Fliegen *Wohlfartia* und *Calliphora* als Larven neben Harnsäure auch Ammoniak aus (BROWN 1936). Nach LEIFERT (1935) kommt beim Schmetterling *Antherea* auch Xanthin neben Harnsäure in den Malpighischen Gefäßen vor, sowie Xanthin und Hypoxanthin im Fettkörper. NELSON (1958) fand bei der Lausfliege *Melophagus* einen Geschlechtsunterschied in der Exkretion, indem die Weibchen Xanthin, Hypoxanthin und Harnsäure ausschieden, die Männchen jedoch nur Harnsäure.

Der Harnsäuregehalt kann durch verschiedenes Futter verändert werden: Bei Protein-Fütterung wird die Harnsäure-Produktion gesteigert (BROWN 1936 bei *Wohlfartia*). Bei der Stechmücke *Aedes aegypti* steigt die Total-N-Exkretion nach einer Blutmahlzeit an, dasselbe gilt für den Harnsäure-Anteil der Exkrete (TERZIAN et al. 1957).

Untersuchungen an Insekten, wobei sowohl Pterine wie Purine berücksichtigt sind, wurden verschiedentlich gemacht. So zeigten HUDSON et al. (1959) an

Oncopeltus fasciatus (Heteroptera), daß das Verhältnis der exkretierten Harnsäure zu den exkretierten Pterinen in Larve und Imago konstant bleibt. DANNEEL und ESCHRICH (1957) untersuchten bei verschiedenen *Drosophila*-Mutanten die Beziehungen zwischen Harnsäuregehalt und Pterinen. Sie stellten nach Augenmaß fest, daß bei Wild-Fliegen (und verschiedenen Mutanten) der Harnsäuregehalt in der Imago konstant bleibt, während bei *white* und *brown* nach 8 Tagen keine Harnsäure mehr nachgewiesen werden kann. Untersuchungen von TAIRA und NAWA (1956, 1958) mit quantitativen Methoden ergaben, daß der Harnsäuregehalt bei *Drosophila* im Laufe der Puppenzeit ansteigt und an deren Ende ein Maximum erreicht. Aus dem ähnlichen Verlauf des Harnsäuregehalts von Mutanten mit wenig Pterinen (*white* und *brown*) und solchen mit viel Pterinen schließen sie, daß keine direkte Beziehung zwischen Harnsäure und Pterinen besteht. GRAF (1959) fand ebenfalls einen Anstieg des Harnsäuregehalts in der Puppe bei allen untersuchten Genotypen von *Drosophila*, sowie eine Abnahme der Harnsäure bis auf Null im Körper von *white*- und *brown*-Imagines im Laufe von 8 Tagen. Mutanten, deren rote Augenpigmente durch andere Loci als *w* und *bw* reduziert werden, zeigten keine Harnsäureabnahme nach dem Schlüpfen. Eine weitere Beziehung zwischen Harnsäure und Pterinen zeigt die Mutante *rosy* von *Drosophila* (HADORN und SCHWINCK 1956a, b; FORREST, GLASSMAN und MITCHELL 1956). Sie weist während des ganzen Lebens kein Isoxanthopterin auf, dagegen ist der Gehalt an 2-amino-6-oxpyteridin, einer Vorstufe des Isoxanthopterins, erhöht. Außerdem fehlt bei *rosy* die Harnsäure, an ihrer Stelle wird Hypoxanthin ausgeschieden.

Die vorliegende Arbeit setzt sich zum Ziel, mit quantitativen Methoden für verschiedene Augenfarbmутanten von *Drosophila melanogaster* die Veränderungen im Harnsäuregehalt während der Entwicklung zu untersuchen. Dabei interessierten besonders solche Mutanten wie *white*, *brown*, *sepiaoid* und *sepia*, die im Pterin-Muster oder in der Veränderung des Pterin- und Puringehalts während der Entwicklung vom Wildtyp abweichen. Die Untersuchungen erstreckten sich auf das Studium der Veränderungen im Harnsäuregehalt bei verschiedener Fütterung (Stickstoff-Belastungsversuche) und nach Transplantationen. Ferner sollte die Uricase-Aktivität der verschiedenen Mutanten bei verschiedenen Futterbedingungen untersucht werden.

II. Material und Methode

Zur Untersuchung kamen folgende Laborstämme von *Drosophila melanogaster*: Wildstamm (Sevelen), *white* (*w*; 1—1,5), *sepiaoid* (*sed*; 3—64,5 \pm), *sepia* (*se*; 3—26,0), *brown* (*bw*; 2—104,5) und *rosy-white* (*ry*²; 3—51 \pm 1).

Es wurde auf Standardfutter (Mais-Zucker-Agar mit einigen Tropfen Hefe) gezüchtet. Für die Versuche mit speziellem Futter wurden die Puppen isoliert, die frischgeschlüpften Fliegen in leere Zuchtflaschen gesetzt und die Lösungen wie folgt dargeboten: Ein Glühröhrchen wurde mit der entsprechenden Lösung gefüllt, ein Wattepfropfen als Docht eingesetzt und das Ganze in die Zuchtflasche gehängt.

Für die Altersbestimmung gelten folgende Genauigkeitsgrenzen: für Larven $\pm 1\frac{1}{2}$ Std, für Puppen ± 3 Std, für die Imagines ± 6 Std. Die Zuchttemperatur wurde bei $25 \pm 0,5^\circ \text{C}$ gehalten.

Pro Chromatogramm wurden je 5—10 Tiere (Larven, Puppen oder Imagines) zerquetscht, mit 0,15 ml 0,5%iger Lithiumcarbonatlösung extrahiert, anschließend zentrifugiert, die überstehende Lösung auf Whatman-Filter-Papier Nr. 1 aufgetragen und dann zweidimensional

aufsteigend chromatographiert (1. Dimension: n-Propanol-Ammoniak 5% 2:1; 2. Dimension: n-Butanol-Eisessig-Wasser 20:3:7).

Harnsäure und Hypoxanthin wurden anhand der R_f -Werte (Kontrolle mit reinen Substanzen) unter einer Hanau-UV-Lampe lokalisiert (HOLIDAY und JOHNSON 1949), die Flecken

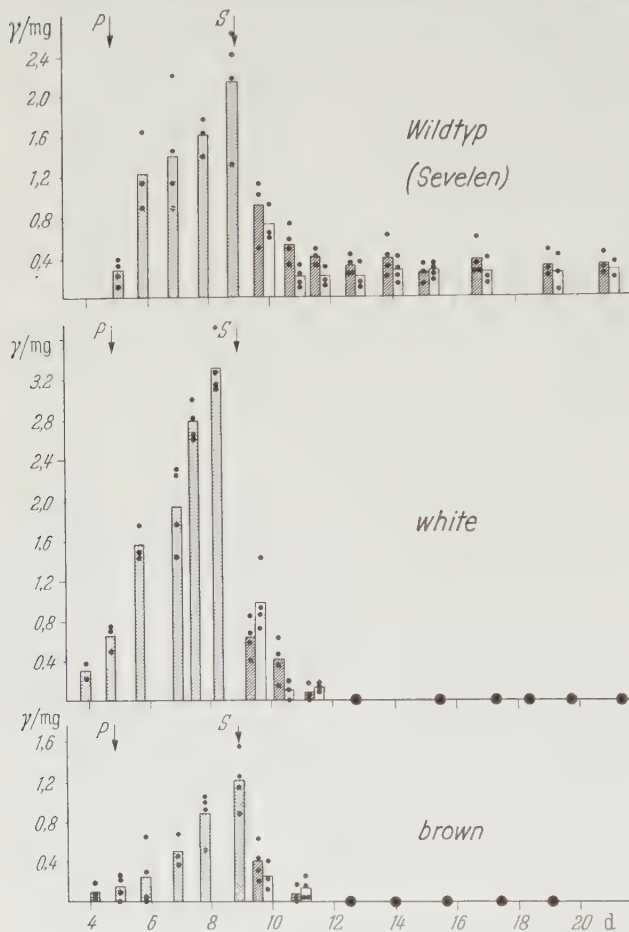


Abb. 1. Harnsäuregehalt in γ pro mg Lebendgewicht bei Standardfutter im Laufe der Entwicklung für die Genotypen Wildtyp (Sevelen), *white* und *brown*. Abszisse: Alter in Tagen (d) nach Eiablage. P Pupariumbildung, S Schlüpfen. Säulen: Mittelwerte; kleine Kreise: Einzelwerte; große Kreise: mehrere Einzelwerte auf Null-Linie; schraffiert: Männchen; weiß: Weibchen; punktiert: Geschlechter nicht unterschieden

gemessen. Die Differenz der beiden Ablesungen wurde direkt als Maß für die Uricase-Aktivität benützt.

III. Die Änderung des Harnsäuregehaltes während der Entwicklung bei verschiedenen Mutanten

Die Abb. 1 und 2 zeigen den Verlauf des Harnsäuregehaltes während der Entwicklung beim Wildtypus (Sevelen) und bei den Mutanten *white* (*w*), *brown* (*bw*), *sepiaoid* (*sed*) und *sepia* (*se*). Alle Werte beziehen sich auf Tiere, die auf Standardfutter gehalten wurden. Auf der Abszisse ist das Alter in Tagen (d) nach Eiablage

ausgeschnitten, mit 5,0 ml 0,5%iger Lithiumcarbonatlösung eluiert und die Absorption im Beckman-Spektrophotometer (Modell DU) gemessen. Für die Harnsäure wurde das Maximum bei 292 $m\mu$, das Minimum bei 260 $m\mu$ (pH 11) bestimmt, für das Hypoxanthin sind die entsprechenden Werte: 258 $m\mu$ und 246 $m\mu$ (pH 11). Aus der Differenz der beiden Ablesungen wurde der Harnsäure- oder Hypoxanthingehalt berechnet, wobei zum Vergleich die Absorptionswerte einer Lösung von 1 γ Harnsäure/ml bzw. 1 γ Hypoxanthin/ml dienten (VISCHER und CHARGAFF 1948).

Zur Bestimmung der Uricase-Aktivität diente folgende Methode (kombiniert nach KALCKAR 1947 und SCHNEIDER und HOGEBOOM 1952): Je 5 Männchen und 5 Weibchen wurden zermalmt und in 0,3 ml 0,1 M Glycinpuffer (pH 9,4) homogenisiert, zentrifugiert und die überstehende Lösung mit weiteren 3,5 ml Glycinpuffer verdünnt. Dann wurden 0,03 ml einer 1/80 M Harnsäurelösung in 1/40 N NaOH zugegeben und das Gemisch beim Absorptionsmaximum von 292 $m\mu$ im Beckman-Spektrophotometer gemessen. Die Proben wurden dann bei 25° C während 30 min inkubiert und die Absorption bei 292 $m\mu$ erneut

aufgetragen. Die Pfeile geben die Zeit der Pupariumbildung (P) und des Schlüpfens (S) an. Die Altersbestimmung erfolgte jeweils ab diesen Zeitpunkten von neuem. Auf der Ordinate ist der Harnsäuregehalt in γ bezogen auf das Lebendgewicht in mg aufgetragen. Jede Säule gibt das Mittel der Messungen von 2—4 Chromatogrammen wieder. Geschlechtsunterschiede sind nur für Imagines nach dem Schlüpfen erfaßt.

Ergebnisse. 1. Alle 5 betrachteten Genotypen zeigen im großen denselben Verlauf des Harnsäuregehalts während der Entwicklung bis zum Schlüpfen. Überall läßt sich ein starker Anstieg während der Larven- und Puppenzeit erkennen. Für die Puppe ist dies leicht verständlich: Hier wird die Harnsäure gespeichert, da ja eine Abgabe nach außen ausgeschlossen ist.

2. Unmittelbar nach dem Schlüpfen nimmt der Harnsäuregehalt stark ab, was auf die Abgabe des Meconiums zurückzuführen ist (vgl. HADORN und KÜRSTNER 1955), mit dem offenbar sehr viel Harnsäure aus dem Körper entfernt wird.

3. Nach der ersten starken Abnahme, die bei allen 5 Genotypen etwa parallel verläuft, bleibt der Harnsäuregehalt beim Wildtyp ungefähr auf einem konstanten Niveau von 0,3 γ /mg.

4. Sowohl bei *white* und *brown* wie bei *sepiooid* nimmt der Harnsäuregehalt weiter ab. Für *w* und *bw* ist nach 4 Tagen nach dem Schlüpfen (13. Lebenstag)

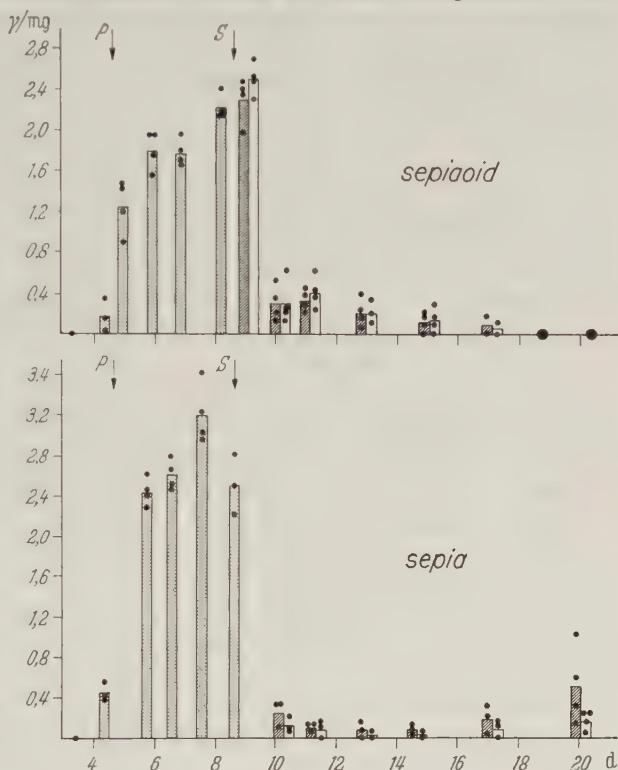


Abb. 2. Harnsäuregehalt in γ pro mg Lebendgewicht bei Standardfutter im Laufe der Entwicklung für die Genotypen *sepiooid* und *sepia*. Abszisse: Alter in Tagen (d) nach Eiablage. P Pupariumbildung, S Schlüpfen. Säulen: Mittelwerte; kleine Kreise: Einzelwerte; große Kreise: mehrere Einzelwerte auf Null-Linie; schraffiert: Männchen; weiß: Weibchen; punktiert: Geschlechter nicht unterschieden

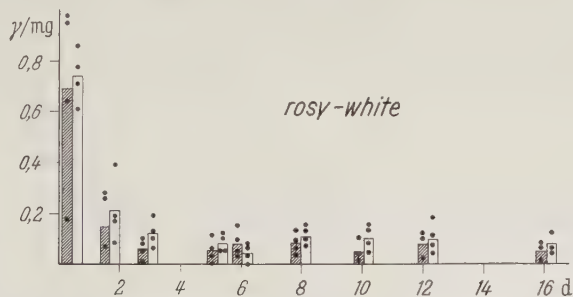


Abb. 3. Hypoxanthingehalt in γ pro mg Lebendgewicht bei Standardfutter von *rosy-white*-Imagines im Laufe der Entwicklung. Abszisse: Alter in Tagen (d) nach Schlüpfen der Imagines. Schraffiert: Männchen; weiß: Weibchen; Säulen: Mittelwerte; Kreise: Einzelwerte

keine Harnsäure mehr nachweisbar, für *sed* nach 10 Tagen (19. Lebenstag).

5. Bei *sepia* nimmt der Harnsäuregehalt bei der Imago vorerst ebenfalls ab, beginnt dann wieder anzusteigen, so daß am 20. Lebenstag wieder das Niveau eines Wildstammes erreicht ist.

6. Bei *w* wird während der Puppenzeit mehr Harnsäure als bei den übrigen Genotypen gespeichert (3,3 γ /mg). Auch *se* zeigt eine übernormale Konzentration (etwa 3,0 γ /mg), während *sed* und *+* am Ende der Puppenzeit ungefähr gleich viel (je 2,2 γ /mg) Harnsäure enthalten. Bei *bw* wird sogar nur ein Gehalt von 1,2 γ /mg erreicht.

7. Bei den Imagines besteht, bezogen auf das Körpergewicht, ein gesicherter Unterschied im Harnsäuregehalt zwischen Männchen und Weibchen bei *+* und *se*, hingegen nicht bei *w* und *sed*. Berechnet man den Harnsäuregehalt jedoch pro Individuum (abgesehen vom Gewicht), so ergibt sich für keinen der Genotypen ein gesicherter Unterschied.

Das bedeutungsvollste Ergebnis unserer Bestimmungen ist das vollständige Fehlen der Harnsäure bei den Mutanten *white* und *brown* einige Tage nach dem Schlüpfen. Dies entspricht den Befunden von DANNEEL und ESCHRICH (1957). Es lassen sich daher folgende Hypothesen aufstellen:

a) Die Imagines der Mutanten *w* und *bw* sind nicht imstande Harnsäure neu zu bilden, während der Wildtyp dazu fähig ist.

b) Zwar können sowohl *+* (Wildstamm) wie *w* bzw. *bw* Harnsäure bilden. Sie wird aber nur bei *+* gespeichert, bei *w* und *bw* jedoch sofort ausgeschieden, so daß die geringe Menge im Körper auf dem Chromatogramm nicht nachweisbar wird.

Eine Möglichkeit, diese beiden Hypothesen zu prüfen, zeigte sich im Studium der Auswirkungen einer Kombination des *w*-Locus mit dem Faktor *rosy* auf den Harnsäuregehalt der Imagines. Die Mutante *rosy* kann keine Harnsäure bilden, da ihr das Ferment Xanthindehydrogenase fehlt, das Hypoxanthin bzw. Xanthin zu Harnsäure oxydiert (FORREST, GLASSMAN und MITCHELL 1956, HADORN 1956, MORITA 1958, MITCHELL, GLASSMAN und HADORN 1959). Nach FORREST, GLASSMAN und MITCHELL (1956) ist Xanthindehydrogenase bei *w*-Larven vorhanden. Auch läßt sich auf den *w*-Chromatogrammen kein Hypoxanthin nachweisen. Der Syntheseblock für Harnsäure, der nach der obigen Hypothese bestehen müßte, sollte demnach vor der Bildung des Hypoxanthins liegen. Es wäre daher zu erwarten, daß *rosy-white*-Imagines auch kein Hypoxanthin bilden könnten.

Die Abb. 3 gibt den Hypoxanthingehalt von *ry/ry*; *w/w*-Weibchen und *ry/ry*; *w/+*-Männchen nach dem Schlüpfen der Imagines wieder. Auf der Abszisse ist hier das Alter der Imagines in Tagen (d) nach dem Schlüpfen aufgetragen, auf der Ordinate der Hypoxanthingehalt in γ pro mg Lebendgewicht. Es zeigt sich, wie erwartet, auch hier Hypoxanthin an Stelle von Harnsäure. Unmittelbar nach dem Schlüpfen erfolgt bei *rosy-white*-Imagines ebenfalls eine starke Abnahme des Hypoxanthingehalts. Später bleibt der Gehalt auf einem mehr oder weniger konstanten Niveau von etwa 0,1 γ /mg.

Es wird also bei *rosy-white*-Fliegen auch in der Imago Hypoxanthin gebildet. *ry* wirkt in dieser Hinsicht epistatisch über *w*. Nach der Hypothese a) sollte, wie oben dargelegt, bei *rosy-white*-Tieren kein Hypoxanthin auftreten. Da das Gegen-

teil der Fall ist, ist die Hypothese, daß die *white*-Imago zur Harnsäurebildung unfähig ist, wahrscheinlich abzulehnen. Auch Hypothese b scheint nicht zu stimmen: Wenn Exkretmaterialien (Harnsäure, Hypoxanthin, fluoreszierende Stoffe) von *w* nicht zurückgehalten werden können, so sollte auch hier kein Hypoxanthin mehr nachgewiesen werden können. Eine weitere Hypothese zur Deutung des Fehlens von Harnsäure bei *white*-Imagines soll später (S. 58) geprüft werden.

IV. Transplantationsversuche

Bei der Mutante *white* sind, wie schon in der Einleitung bemerkt, vom 4. Tage an nach dem Schlüpfen keine Pterine mehr nachweisbar. HADORN (1954b) zeigte dies für das Isoxanthopterin. Ähnliches gilt auch für andere fluoreszierende Stoffe. Der Harnsäuregehalt von *w*-Fliegen ist, wie vorstehend geschildert, ebenfalls nach 4 Tagen gleich Null bzw. nicht nachweisbar. Es besteht also eine auffällige Parallelität zwischen Pterinen und Harnsäure bei *white*. Hingegen enthält der Wildtyp sowohl Harnsäure wie Pterine während des ganzen Lebens.

Falls die *white*-Imago keine Harnsäure zu bilden vermag (S. 46) so fragt es sich, was geschieht, wenn pigmentierte Augen oder andere Teile von Tieren des Wildtyps in *white* implantiert werden. Es wurden daher folgende Transplantationen gemacht:

1. *Augen*. Es wurden je 2 Augenscheiben von +-Spendern in *white*-

Larven des 3. Stadiums implantiert. Die Abb. 4 zeigt den Harnsäuregehalt in verschiedenen Altersstadien. Jeder Säule und jedem Punkt auf der Null-Linie entspricht ein Chromatogramm aus 7 Fliegen mit Implantaten. Nach 3 Tagen nach dem Schlüpfen läßt sich auch bei *w*-Fliegen, die ausgebildete +-Augen enthalten, keine Harnsäure mehr nachweisen.

2. *Malpighische Gefäße*. Es wurden je 2 Paar Malpighische Gefäße von +-Spendern in *white*-Larven implantiert. Die Abb. 4 zeigt einen entsprechenden Verlauf des Harnsäuregehalts wie für Tiere mit implantierten Augen und für *w*-Fliegen ohne Implantate. Auch hier läßt sich 3 Tage nach dem Schlüpfen keine Harnsäure mehr nachweisen.

Ergebnis. Der Harnsäurestoffwechsel der *white*-Mutante wird weder durch implantierte +-Augen noch durch Malpighische Gefäße der Wildrasse beeinflusst. Andererseits färben sich die implantierten +-Augen aus. Es scheint also kein einfacher Zusammenhang von Harnsäuregehalt und Synthese der Augenpigmente zu bestehen, noch können die +-Malpighischen Gefäße etwas zur Erhöhung des Harnsäuregehaltes beitragen.

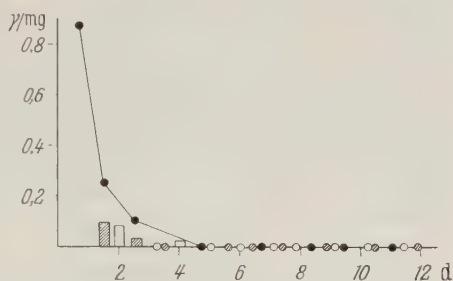


Abb. 4. Harnsäuregehalt in γ pro mg Lebendgewicht von *white*-Imagines. Abszisse: Alter in Tagen (d) nach dem Schlüpfen der Imagines. Jede Säule und jeder Punkt auf der Null-Linie repräsentiert ein Chromatogramm aus 7 Fliegen (Männchen und Weibchen nicht unterschieden). Schraffierte Säulen und schraffierte Kreise: Gehalt nach Implantation von 2 Wild-Augen pro Fliege; weiße Säulen und weiße Kreise: Gehalt nach Implantation von 2 Paar Malpighischen Gefäßen von Wild-Spendern; der gebrochene Streckenzug verbindet die Mittelwerte der Harnsäuregehalte (schwarze Kreise) von *white*-Männchen ohne Implantate

V. Fütterungsversuche

1. Fütterung mit Zucker-Glykokoll-Glutamin

Es besteht, wie bereits angedeutet (S. 46), die Möglichkeit, daß *white*-Fliegen zwar Harnsäure produzieren können, die gebildete Harnsäure aber sofort ausscheiden. Bei vermehrter Bildung könnte dann eventuell doch wieder Harnsäure im

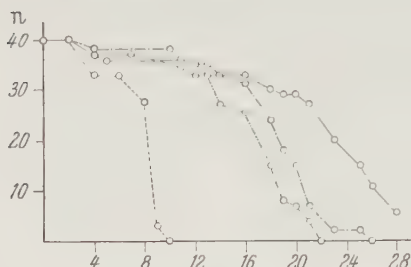


Abb. 5. Lebensdauer von *white*-Imagines bei verschiedener Fütterung. Abszisse: Alter in Tagen (d) nach dem Schlüpfen. n : Zahl der überlebenden Tiere. Futter: — — — destilliertes Wasser, — — — Zuckerlösung 5 %, — · — Zuckerlösung 10 %, — · · — Zuckerlösung 15 %

Körper nachweisbar sein. Um dies zu prüfen, sollten die Fliegen einer Stickstoffbelastung unterworfen werden.

In vitro-Versuche an der Taubenleber ergaben als Harnsäurebausteine Glykokoll, Glutamin, Kohlendioxyd und Formiat (BUCHANAN, SONNE und DELLUVA 1948, SHEMIN und RITTENBERG 1947, SONNE, BUCHANAN und DELLUVA 1948, SONNE, LIN und BUCHANAN 1953, alle Arbeiten zit. in GOLDTWAITH, PEABODY und GREENBERG 1955). ANDERSON und PATTON (1955) inkubierten Fettkörperextrakte

von *Prodenia eridania* (Lepidoptera) und *Tenebrio molitor* (Coleoptera) in vitro mit verschiedenen Stoffen um die Auswirkung auf den Harnsäuregehalt zu studieren. Sie fanden keine Erhöhung des Harnsäuregehalts bei Zugabe von Glykokoll, Glykokoll + Ammonchlorid, Glykokoll + Formiat, Glutamin + Ammonchlorid. HELLER und JEZEWSKA (1959) fanden jedoch bei gleichzeitiger Zugabe aller Vorläufer eine Steigerung des Harnsäuregehalts im Homogenat von Fettkörpern und Därmen von *Antheraea pernyi* (Raupe und Puppe). Für den Stickstoffbelastungsversuch wurden deshalb Glutamin und Glykokoll im Überschuß gefüttert.

In einem Vorversuch wurden frischgeschlüpfte *white*-Fliegen mit destilliertem Wasser oder Zuckerlösung von 5 %, 10 % und 15 % gefüttert. In Abb. 5 sind die Ergebnisse dargestellt. Es zeigt sich, daß die Fliegen bei Konzentrationen zwischen 5 und 10 % am längsten leben; jedenfalls waren bei einer Konzentration von 10 % nach 18 Tagen, bei einer solchen von 5 % nach 23 Tagen noch 50 % der Tiere am Leben.

Für die Fütterungsversuche wurden deshalb folgende Lösungen verwendet:

1. Zuckerlösung 7,5 %,
2. Eine Lösung von Zucker (7,5 %), Glykokoll und Glutamin ($291 \mu\text{Mol Glykokoll}/\text{cm}^3 - 21,825 \text{ mg}/\text{cm}^3 = 4,07 \text{ mg Glykokoll-N}/\text{cm}^3$; $291 \mu\text{Mol Glutamin}/\text{cm}^3 = 42,195 \text{ mg}/\text{cm}^3 - 8,1 \text{ mg Glutamin-N}/\text{cm}^3$.) Diese Konzentrationen wurden bei allen Experimenten beibehalten. Die Lösungen wurden nach jeweils 3 Tagen erneuert. Hierbei wurden in eine leere Futterflasche je 40 Fliegen eingesetzt. Die Fliegen wurden in üblicher Weise chromatographiert und der Harnsäuregehalt gemessen.

Die Abb. 6a zeigt, daß beim Wildstamm mit Zucker-Glykokoll-Glutamin-Futter der Harnsäuregehalt gegenüber Standardfutter stark zunimmt. Anfänglich beträgt der Harnsäuregehalt bei Zucker-Aminosäurenfutter das Dreifache des Gehaltes bei Standardfütterung, er nimmt dann vom 7. Tage nach dem

Schlüpfen an weiter zu und erreicht nach 14 Tagen das Siebenfache, während der Gehalt bei Standardfutter in dieser Zeit konstant bleibt. Der erreichte Stand des Harnsäuregehaltes bei 14tägigen Fliegen (etwa 2,2 γ /mg) entspricht ungefähr dem Gehalt von Puppen vor dem Schlüpfen (Abb. 1). Die Versuchsserie mit Zuckerlösung allein (Abb. 6b) ergibt vorerst Harnsäurewerte, die denjenigen mit Standardfutter entsprechen und zeigt dann vom 9. Tage an nach dem Schlüpfen ein Absinken, so daß nach 14—16 Tagen keine Harnsäure mehr nachgewiesen werden kann.

Die Abb. 6c und d geben die Messungen bei *white* wieder. Wie erwartet, läßt sich bei Zuckerfütterung (Abb. 6d) gar keine Harnsäure nachweisen. Bei Fütterung mit Zucker-Glykokoll-Glutamin (Abb. 6c) wird hingegen sehr viel Harnsäure gebildet. Der Gehalt erreicht nach 6 Tagen nach dem Schlüpfen einen Stand von etwa 1,5 γ /mg (Männchen und Weibchen zusammen), dies ist rund die Hälfte des maximalen Gehaltes der Puppe (Abb. 1). Der Gehalt nimmt indessen vom 6. bis zum 15. Tag kontinuierlich ab bis auf ein Niveau von 0,2 γ /mg.

Es lassen sich somit folgende Tatsachen festhalten:

1. Fütterung mit Zucker allein ergibt keinen (*white*) oder verminderten Harnsäuregehalt (Wildtyp).

2. Fütterung mit Zucker-Glykokoll-Glutamin gibt sowohl bei *white* wie beim Wildtyp eine Zunahme des Harnsäuregehaltes.

3. Die Mutante *w* ist demnach auch als Imago fähig Harnsäure zu bilden. Die auf S. 46 aufgestellte Hypothese, wonach die *white*-Imago keine Harnsäure zu bilden vermöchte, ist somit zu verwerfen. Dabei bleibt die Frage offen, ob Harnsäure hier erscheint, weil das Substrat nun in genügender Menge vorliegt oder ob

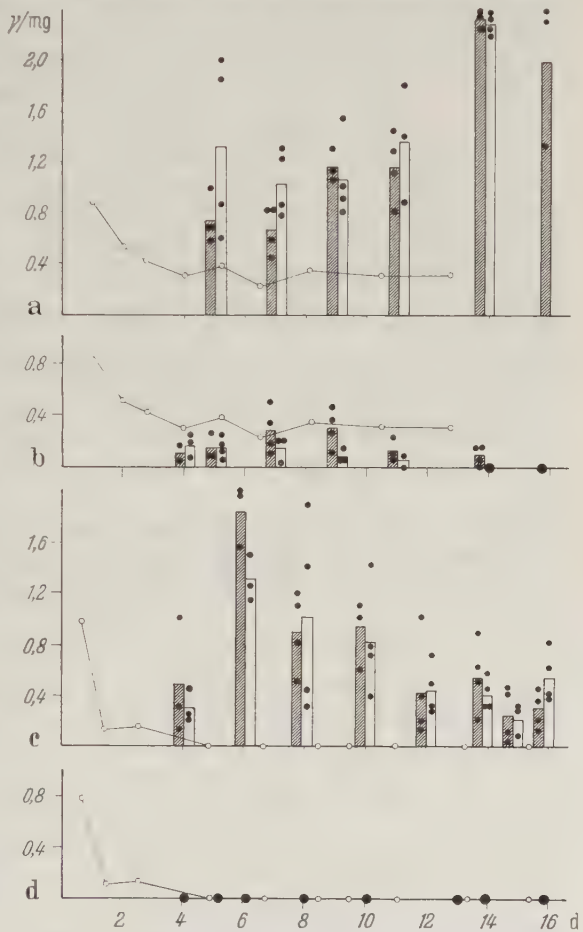


Abb. 6a—d. Harnsäuregehalt von verschiedenen Genotypen in γ pro mg Lebendgewicht bei verschiedenem Futter. Abszisse: Alter in Tagen (d) nach dem Schlüpfen der Imagines. a Wildstamm (Sevelen), Futter: Zucker-Glutamin-Glykokoll; b Wildstamm (Sevelen), Futter: Zucker; c *white*, Futter: Zucker-Glutamin-Glykokoll; d *white*, Futter: Zucker. Schraffierte Säulen: Mittelwerte der Gehalte der Männchen; weiße Säulen: Mittelwerte der Gehalte der Weibchen; kleine schwarze Kreise: Einzelwerte; große Kreise: mehrere Einzelwerte auf Null-Linie. Die gebrochenen Streckenzüge verbinden die Mittelwerte des Gehaltes der Männchen bei Standardfutter (kleine weiße Kreise)

etwa durch das Überangebot an Substrat die Bildung eines sonst nicht mehr vorhandenen oder nicht mehr aktiven Fermentes erneut angeregt wird. Als 3. Möglichkeit läßt sich eine Inhibitorwirkung von Glutamin-Glykokoll auf die Harnsäureausscheidung denken.

4. Die Befunde lassen sich leicht in Einklang bringen mit der Auffassung, daß *white* weniger Harnsäure zu speichern vermag als der Wildtyp.



Abb. 7. Harnsäuregehalt von *white*-Imagines in γ pro mg Lebendgewicht bei verschiedenem Futter. Abszisse: Alter in Tagen (d) nach dem Schlüpfen der Imagines. Säulen: Mittelwerte; kleine Kreise: Einzelwerte; große Kreise: mehrere Einzelwerte auf Null-Linie; schraffierte Säulen: Gehalt der Männchen bei Fütterung mit Zucker-Glutamin; weiße Säulen: Gehalt der Weibchen bei Fütterung mit Zucker-Glutamin; schwarze große Kreise: Gehalt von Männchen und Weibchen bei Fütterung mit Zucker-Glutamin; weiße große Kreise: Gehalt von Männchen und Weibchen bei Fütterung mit Zucker-Glykokoll

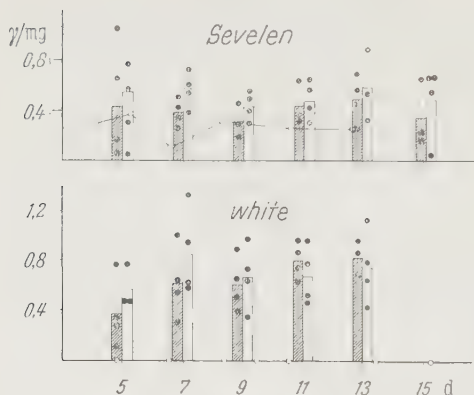


Abb. 8. Harnsäuregehalt von verschiedenen Genotypen in γ pro mg Lebendgewicht bei Fütterung mit Zucker-Glykokoll-Asparagin. Abszisse: Alter in Tagen (d) nach dem Schlüpfen der Imagines. Schraffierte Säulen: Mittelwerte des Gehaltes der Männchen; weiße Säulen: Mittelwerte des Gehaltes der Weibchen; schwarze Kreise: Einzelwerte; weiße Kreise: Mittelwerte des Gehaltes der Männchen bei Standardfutter. Der gebrochene Streckenzug verbindet die Mittelwerte der Gehalte der Wild-Männchen bei Standardfutter

Lösung von Zucker (7,5%) und Glutamin (42,195 mg/cm³ wie oben) zeigt sich, wie in Abb. 7 (Säulen, große schwarze Kreise) dargestellt, daß um den 7.—9. Tag eine geringe Menge von Harnsäure nachgewiesen werden kann. Sie fehlt hingegen nach 11 Tagen wieder.

Ein Vergleich der Ergebnisse bei Fütterung der einzelnen Komponenten (Abb. 7) mit dem Gehalt bei gleichzeitiger Gabe der beiden Aminosäuren (Abb. 6c) ergibt, daß zur Bildung von Harnsäure offenbar Glutamin allein

5. Es wird später an Hand der unterschiedlichen Uricase-Aktivität zu zeigen sein, inwiefern die Aussagen von 3 und 4 zutreffen.

6. Bei + nimmt der Harnsäuregehalt vom 7. —15. Tage nach dem Schlüpfen zu, bei *w* in dieser Zeit ab. Auch die Bedeutung dieser Zu- und Abnahmen soll später im Zusammenhang mit den Uricase-Messungen diskutiert werden (S. 58).

2. Fütterung mit Glutamin und Glykokoll allein

Da der Harnsäuregehalt bei Fütterung mit Zucker-Glutamin-Glykokoll sowohl beim Wildtyp wie bei *white* stark ansteigt, ist jetzt zu untersuchen, wie sich die einzelnen Komponenten verhalten:

a) Fütterung mit Zuckerlösung-Glykokoll. *white*-Fliegen wurden mit einer Lösung von Zucker (7,5%) und Glykokoll (21,825 mg/cm³ wie oben angegeben) gefüttert. Abb. 7 (weiße Kreise) zeigt, daß sich bei diesem Futter vom 4. Tage nach dem Schlüpfen an in keinem Stadium Harnsäure nachweisen läßt. Glykokoll allein vermag also nicht zu einer Erhöhung des Harnsäuregehaltes beizutragen.

b) Fütterung mit Zuckerlösung-Glutamin. Bei Fütterung der frischgeschlüpften *white*-Imagines mit einer

nur ungenügend ausgenützt wird. Bei Anwesenheit von Glykokoll wird bedeutend mehr Harnsäure gebildet.

3. Fütterung mit Zucker-Glykokoll-Asparagin

Da die Fütterung von Imagines mit Zucker-Glutamin-Glykokoll eine starke Zunahme des Harnsäuregehaltes ergibt, stellte sich die Frage, ob sich Glutamin etwa durch Asparagin ersetzen lasse. Es wurde deshalb eine Lösung von Zucker (7,5%), Glykokoll ($291 \mu\text{Mol}/\text{cm}^3$) und Asparagin ($291 \mu\text{Mol}/\text{cm}^3 = 38,41 \text{ mg}/\text{cm}^3$) in der oben (S. 48) beschriebenen Weise gefüttert. Die Abb. 8 gibt die Resultate für Sevelen (Wildstamm) und *white* wieder.

Ergebnisse. 1. *white* zeigt auch bei Fütterung mit Zucker-Glykokoll-Asparagin einen höheren Harnsäurespiegel als mit Standardfutter.

2. Im Gegensatz zur Fütterung mit Zucker-Glutamin-Glykokoll, wo der Harnsäuregehalt anfänglich hoch ist und im Laufe der Zeit abnimmt (Abb. 6c) bleibt der Gehalt von *white*-Imagines bei Zucker-Glykokoll-Asparagin-Futter während der beobachteten Dauer von 10 Tagen ungefähr konstant und zwar auf einer Höhe von etwa $0,7 \gamma/\text{mg}$ Lebendgewicht.

3. Das Niveau der Harnsäure beim Wildtyp bleibt bei Fütterung mit Zucker-Glykokoll-Asparagin während der Altersstadien 5—15 Tage ungefähr konstant. Dasselbe gilt für Standardfutter (Abb. 1), während sich bei Fütterung mit Zucker-Glykokoll-Glutamin eine ständige Zunahme im Alter von 5—14 Tagen ergibt (Abb. 6a).

4. Der Harnsäuregehalt bei Zucker-Glykokoll-Asparagin-Futter ist bei *w* durchschnittlich höher als bei *+* mit demselben Futter. Der Unterschied ist statistisch gesichert.

VI. Studium der Exkrete bei verschiedenen Genotypen

In den Fütterungsversuchen mit Zucker-Glykokoll-Glutamin trat bei *white* nach 10 Tagen neben Harnsäure auch sehr wenig Isoxanthopterin auf. Isoxanthopterin ist, wie schon erwähnt, nach 4 Tagen auf dem Chromatogramm der normal ernährten *white*-Fliegen nicht mehr sichtbar.

Stimmt nun die Annahme, daß *white* zwar zur Bildung von Harnsäure und fluoreszierenden Stoffen fähig ist, sie aber nicht zu speichern vermag (S. 46), so läßt sich vermuten, daß dann auch in der Zeit, wo sich im Körper nichts mehr nachweisen läßt, noch Harnsäure und fluoreszierende Stoffe ausgeschieden werden, eventuell in erhöhter Menge. Eine solche erhöhte Ausscheidung bei *white* gegenüber dem Wildtyp konnten schon HADORN und KÜRSTEINER (1955) für die fluoreszierenden Stoffe in den Erstexkreten des Meconiums zeigen.

Zur Untersuchung der Exkrete wurden jeweils 40 Männchen in leere Tablettenröhrchen gesetzt. Das Futter (Zuckerlösung bzw. Zucker-Glykokoll-Glutamin-Lösung in den auf S. 48 angegebenen Konzentrationen) wurde auf einem Wattebausch direkt ins Röhrchen gegeben. Die Fliegen wurden während 5 Tage im Röhrchen gelassen, dann herausgeholt. Hierauf wurden die Exkrete an Glas und Watte in 0,2 ml 0,5% Lithiumcarbonatlösung aufgenommen und anschließend zweidimensional chromatographiert.

Die Abb. 9 zeigt Kopien von Chromatogrammen der Exkrete vom 2.—7. Tag und vom 9.—14. Tag nach dem Schlüpfen der Imagines. Zum Vergleich wurden

noch die Kopien von Chromatogrammen ganzer 2 Tage alter Männchen aufgezichnet. Besondere Aufmerksamkeit wurde den Flecken Harnsäure (*H*), Isoxanthopterin (*I*) und Xanthopterin (*X*) gewidmet, die überall auftreten. Die

anderen fluoreszierenden Flecken sind hingegen nicht immer auf allen Chromatogrammen sichtbar.

Ergebnisse. 1. Beim Wildtyp zeigen die Chromatogramme der Exkrete vom 2.—7. Tag bei Zuckerfütterung (Abb. 9b) und die Chromatogramme des Extraktes aus homogenisierten ganzen 2 Tage alten Männchen (Standardfutter, Abb. 9a) ein ähnliches Stoffinventar. Von den meisten der betrachteten Stoffe wird während dieser Zeit offenbar ein Teil ausgeschieden. Nach 9—14 Tagen wird bei Zuckerfütterung ebenfalls Harnsäure (*H*) und Isoxanthopterin (*I*) exkretiert (Abb. 9c), an anderen absorbierenden und fluoreszierenden Stoffen hingegen sind die Exkrete verarmt. Insbesondere läßt sich kein Xanthopterin mehr nachweisen

2. Auch bei Fütterung von +-Fliegen mit Zucker-Glykokoll-Glutamin (Abb. 9d, e) werden annähernd dieselben Stoffe ausgeschieden, die in der Imago nachweisbar sind (Abb. 9a), wenn auch das Muster etwas ärmer scheint. Insbesondere ist auch nach 9—14 Tagen mit Zucker-Glykokoll-Glutamin wieder Xanthopterin (*X*) nachweisbar. Neu scheint ein violetter Fleck links oben aufzutreten, sowie ein gelber Fleck rechts oben.

3. Das Muster der ausgeschiedenen Stoffe des Wildtyps verarmt bei Zuckerfütterung im Laufe der Zeit (Abb. 9b—c), nimmt hingegen bei Fütterung mit Zucker-Glykokoll-Glutamin eher an Reichhaltigkeit zu (Abb. 9d—e).

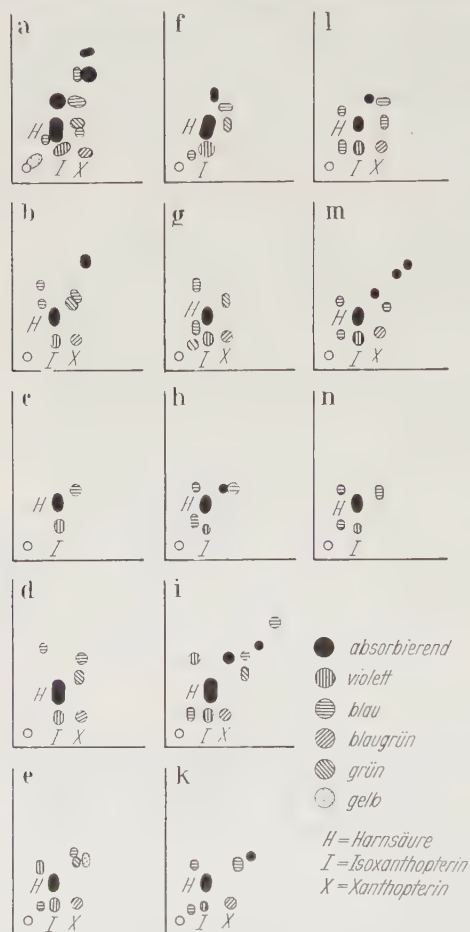


Abb. 9a—n. Halbschematische Darstellung von Chromatogrammen der Exkrete von Imagines verschiedener Genotypen (Männchen). a—e: Sevelen (Wildstamm); f—k: *white*; l—n: *brown*; a, f, l: Stoffmuster von homogenisierten ganzen Männchen im Alter von 2 Tagen; b, g, m: Exkrete vom 2.—7. Tag nach dem Schlüpfen bei Zuckerfütterung; c, h, n: Exkrete vom 9.—14. Tag bei Zuckerfütterung; d, i: Exkrete vom 2.—7. Tag bei Fütterung mit Zucker-Glykokoll-Glutamin; e, k: Exkrete vom 9.—14. Tag nach Schlüpfen bei Fütterung mit Zucker-Glykokoll-Glutamin

4. Vergleicht man ein Chromatogramm von homogenisierten ganzen 2 Tage alten *white*-Männchen (Abb. 9f) mit den Chromatogrammen der Exkrete von *w* vom 2.—7. Tag (Abb. 9g) und vom 9.—14. Tag (Abb. 9h) bei Zuckerfütterung, so zeigt sich, daß das Muster der Stoffe ungefähr gleich ist. Vom 9.—14. Tag tritt aber kein Xanthopterin auf.

5. Die Chromatogramme der Exkrete von *white* bei Fütterung mit Zucker-Glykokoll-Glutamin (Abb. 9i, k) zeigen ebenfalls ein entsprechendes Muster wie die Chromatogramme der Homogenate ganzer Imagines (Abb. 9f), sowie auch die Chromatogramme der Exkrete bei Zuckerfütterung (Abb. 9g, h). Bei Zucker-Glykokoll-Glutamin-Futter zeigt sich ebenfalls der neue violette Fleck links oben.

6. Das Muster der Exkrete bei *white* nimmt sowohl bei Zuckerfütterung (Abb. 9g, h) wie bei Fütterung mit Zucker-Glykokoll-Glutamin (Abb. 9i, k) im Laufe der Zeit an Reichhaltigkeit ab.

7. Auch die Chromatogramme von *bw* weisen bei Zuckerfütterung (Abb. 9m, n) ein Muster auf, das demjenigen eines Chromatogramms von 2 Tage alten homogenisierten ganzen Männchen (Abb. 9l) entspricht.

8. Es zeigt sich also sowohl für *white* wie für *brown*, daß die Imago auch nach 4 Tagen, wo bei Standardfutter weder Harnsäure noch fluoreszierende Stoffe im Körper festgestellt werden können, zur Bildung aller dieser Stoffe befähigt ist. Dies gilt

Tabelle 1. *Harnsäuregehalt der Exkrete von verschiedenen Genotypen*. Gehalt der Exkrete von je 40 Männchen in γ pro Tag; n = Zahl der Chromatogramme; Z = Zucker, Z-Am = Zucker-Glykokoll-Glutamin

Genotyp	Futter	n	2.—7. Tag	n	9.—14. Tag
<i>+</i>	Z	5	$1,04 \pm 0,262$	4	$0,27 \pm 0,063$
<i>+</i>	Z-Am	3	$1,33 \pm 0,213$	3	$0,86 \pm 0,075$
<i>w</i>	Z	4	$1,13 \pm 0,300$	4	$0,36 \pm 0,102$
<i>w</i>	Z-Am	4	$0,85 \pm 0,466$	5	$1,10 \pm 0,211$
<i>bw</i>	Z	5	$0,70 \pm 0,157$	5	$0,37 \pm 0,124$

auch für Zuckerfütterung, die Art des Futters wirkt deshalb höchstens auf die Menge der gebildeten Stoffe ein.

Die quantitative Auswertung der Resultate stößt auf Schwierigkeiten, da die verwendete Methode nicht genügend genau ist. Tabelle 1 gibt die Meßergebnisse für die Harnsäure wieder.

Unter Berücksichtigung der möglichen Fehlerquellen in der Methodik ergeben sich folgende vorläufige Befunde:

1. In der Periode vom 2.—7. Tag nach dem Schlüpfen wird mehr Harnsäure exkretiert als in der Zeit vom 9.—14. Tag. Vermutlich werden in der 1. Periode noch Reste der Harnsäure ausgeschieden, die in der Puppe gespeichert waren. Es sind wohl auch die Unterschiede in den Mittelwerten (2.—7. Tag) durch den sehr verschiedenen Gehalt dieser Reste zu erklären. Es kann diesen Unterschieden deshalb keine Bedeutung beigemessen werden.

2. Vom 9.—14. Tag wird bei Zucker-Glykokoll-Glutamin-Futter mehr Harnsäure exkretiert als bei Zucker-Futter. Dies ist offenbar auf die vermehrte Stickstoffzufuhr durch die Aminosäuren und dementsprechend größere Harnsäurebildung zurückzuführen.

3. Die Harnsäureausscheidung ist bei *w* und *bw*, entgegen der Erwartung (S. 51), nicht größer als beim Wildtyp (*+*).

Für die Messungen des Isoxanthopterins gilt die gleiche Einschränkung betreffs Genauigkeit wie für die Harnsäure. Für die Messungen wurde eine Apparatur verwendet, die die Messung direkt ab dem Papier erlaubt (vgl. HADORN und KÜHN 1953). Tabelle 2 zeigt die Meßresultate für Isoxanthopterin.

Es lassen sich folgende Ergebnisse herauslesen:

1. Vom 2.—7. Tag nach dem Schlüpfen wird bei jedem Futter mehr Isoxanthopurin exkretiert als vom 9.—14. Tag. Dies läßt sich, wie bei der Harnsäure, verstehen als Ausscheidung des Restes des in der Puppe gespeicherten Isoxanthopterins. Den Unterschieden im Gehalt der Exkrete während der ersten Periode (2.—7. Tag) kommt deshalb keine Bedeutung zu.

Tabelle 2. *Isoxanthopteringehalt der Exkrete von verschiedenen Genotypen*

Gehalt der Exkrete von je 40 Männchen in Meßeinheiten pro Tag; n = Zahl der Chromatogramme; Z = Zucker, Z-Am = Zucker-Glykokoll-Glutamin.

Genotyp	Futter	n	2.—7. Tag	n	9. 14. Tag
+	Z	5	$1,00 \pm 0,110$	4	$0,06 \pm 0,001$
+	Z-Am	3	$0,93 \pm 0,022$	3	$0,08 \pm 0,017$
w	Z	4	$1,43 \pm 0,121$	4	$0,09 \pm 0,020$
w	Z-Am	4	$0,68 \pm 0,021$	5	$0,10 \pm 0,003$
bw	Z	5	$1,06 \pm 0,228$	5	$0,08 \pm 0,010$

2. Vom 9.—14. Tag ist die Exkretion von Isoxanthopurin allgemein gering. Es lassen sich keine Unterschiede bei verschiedenem Futter erkennen.

3. Der Isoxanthopteringehalt der Exkrete ist, entgegen der Erwartung (S. 51) bei *white* bzw. *brown* nicht größer als beim Wildtyp (+).

VII. Die Uricase-Aktivität von verschiedenen Genotypen bei verschiedenem Futter

Die Fütterungsversuche mit Zucker-Glykokoll-Glutamin zeigen für Sevelen (Wildtyp) eine Zunahme des Harnsäuregehaltes in der Imago im Laufe der Zeit (Abb. 6a), für *white* eine Abnahme während derselben Periode (Abb. 6c). Nach WIGGLESWORTH (1942) ist für verschiedene Insekten (*Lucilia*, *Antheraea*) bekannt, daß sie die Harnsäure mit Hilfe von Uricase weiter zu Allantoin abbauen. Im besonderen ist das Vorhandensein von Uricase bekannt für muscide Fliegen (TRUSZKOWSKI und CHAJKINOWNA 1935), während für *Drosophila* meines Wissens noch nichts darüber bekannt ist.

Um nun zu prüfen, ob der Abbau der Harnsäure durch Uricase am Zustandekommen der Verschiedenheiten im Harnsäuregehalt beteiligt sei, wurde die Uricase-Aktivität bestimmt. Es wurden Imagines von Sevelen (Wildstamm) und *white* sofort nach dem Schlüpfen umgesetzt und auf verschiedenem Futter gehalten (Standardfutter, Zuckerlösung, Lösung von Zucker-Glykokoll-Glutamin in den auf S. 48 angegebenen Konzentrationen). Bei *brown* wurde nur für Standardfutter untersucht.

Die Abb. 10 und 11 zeigen auf der Abszisse (X) das Alter der Imago in Tagen (d), auf der Ordinate (Y) die Abnahme der Extinktion (in Meßeinheiten E) für einen Extrakt aus je 5 Männchen und 5 Weibchen bei 292 $m\mu$ während 30 min. Die Methode ist auf S. 44 beschrieben. Zur Verdeutlichung wurden die Regressionen (R) berechnet. Sie werden auch am besten zur Beurteilung der Resultate verwendet. Nach einem statistischen Test beurteilt, werden die Mittelwerte für *white* bei Standardfutter (Abb. 10d) und für Sevelen bei Zucker-Glykokoll-Glutamin-Futter (Abb. 10b) durch eine Gerade schlecht repräsentiert. Da aber hauptsächlich die Richtungstendenz der Uricase-Aktivität verdeutlicht werden sollte,

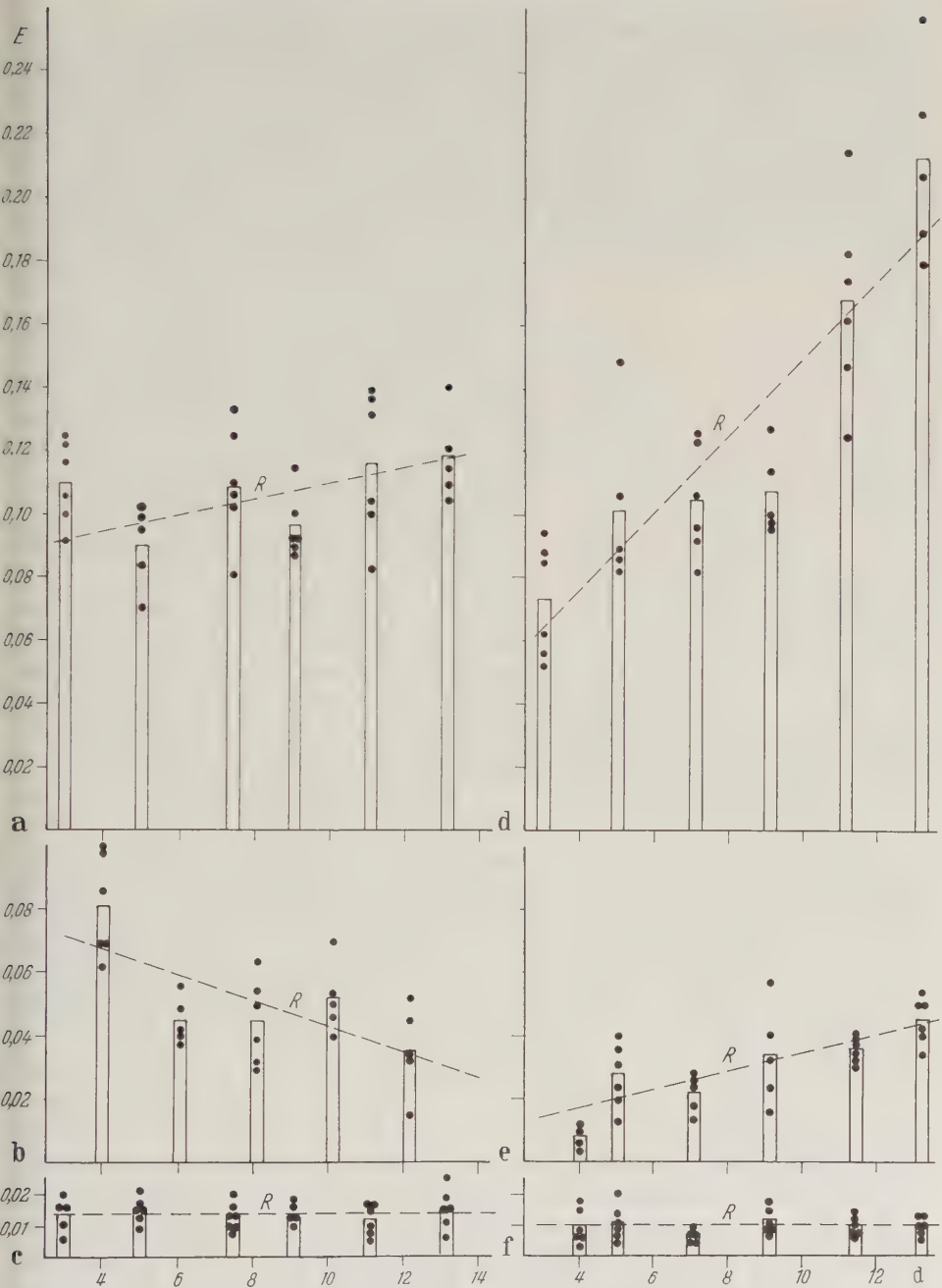


Abb. 10a—f. Uricase-Aktivität von Extrakten verschiedener Genotypen bei verschiedenem Futter. Ordinate: Uricase-Aktivität in Meßeinheiten (E). Abszisse: Alter in Tagen (d) nach Schlüpfen der Imagines. Säulen=Mittelwerte, Punkte=Einzelwerte. *R* Regressionsgerade. a Wildstamm (Sevelen) auf Standardfutter, b Wildstamm (Sevelen) auf Zucker-Glykokoll-Glutamin-Futter; c Wildstamm (Sevelen) auf Zucker-Futter. d *white* auf Standardfutter, e *white* auf Zucker-Glykokoll-Glutamin-Futter; f *white* auf Zucker-Futter

wurden auch hier Geraden als erste Näherung verwendet. Für alle anderen berechneten Regressionen sind die Geraden zulässig.

Ergebnisse. 1. Die Uricase-Aktivität von Sevelen bleibt bei Zucker-Fütterung (Abb. 10c) während der ganzen betrachteten Periode von 4—13 Tagen nach dem Schlüpfen konstant auf einem Niveau von etwa 0,015 E (Regressionsgerade $Y = 0,014 - 0,00007 X$; sie ist von einer Horizontalen nicht gesichert verschieden).

2. Die Uricase-Aktivität bei Sevelen steigt mit Standardfutter im Laufe der Zeit leicht an (Abb. 10a). Die Regressionsgerade ($Y = 0,092 + 0,0020 X$) ist dabei aber nicht gesichert verschieden von einer Horizontalen. In der betrachteten Periode liegt das mittlere Niveau bei etwa 0,105 E, d.h. die Aktivität bei Standardfutter ist etwa 7mal so groß wie bei Zuckerfütterung.

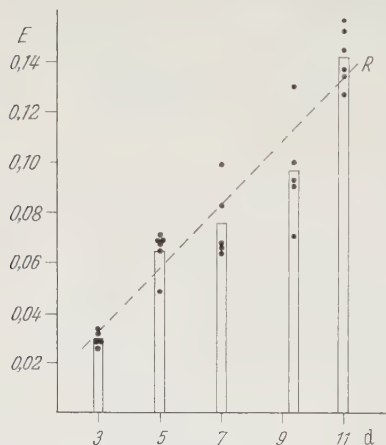


Abb. 11. Uricase-Aktivität der Extrakte von *brown* auf Standardfutter. Ordinate: Uricase-Aktivität in Meßeinheiten (E). Abszisse: Alter in Tagen (d) nach Schlüpfen der Imagines. Säulen = Mittelwerte, Punkte = Einzelwerte, R Regressionsgerade

3. Die Uricase-Aktivität bei Sevelen weist für Zucker-Glykokoll-Glutamin-Fütterung (Abb. 10b) eine sinkende Tendenz auf im Laufe der Zeit. Die Aktivität nimmt von etwa 0,070 E nach 4 Tagen nach dem Schlüpfen bis auf 0,035 E nach 12 Tagen ab. Die Regressionsgerade ($Y = 0,085 - 0,0042 X$) ist gesichert verschieden von einer Horizontalen.

4. Bei *white* ist die Uricase-Aktivität bei Zucker-Fütterung (Abb. 10f) ebenfalls konstant und zwar bleibt sie auf einem Niveau von etwa 0,010 E (Regression $Y = 0,010 + 0,00002 X$; von einer Horizontalen nicht gesichert verschieden).

5. Die Uricase-Aktivität bei *white* zeigt bei Standardfutter (Abb. 10d) eine stark zunehmende Tendenz. Sie steigt von einem

mittleren Wert von 0,073 E im Alter von 3 Tagen bis auf 0,213 E nach 13 Tagen nach dem Schlüpfen (Regressionsgerade $Y = 0,026 + 0,0126 X$).

6. Auch bei Zucker-Glykokoll-Glutamin-Futter (Abb. 10e) zeigt die Aktivität bei *white* eine Zunahme vom 4.—13. Tag von 0,015 E auf 0,045 E (Regression $Y = 0,006 + 0,0029 X$). Die Zunahme ist jedoch wesentlich geringer als bei Standardfutter.

7. Bei *brown* (Standardfutter, Abb. 11) nimmt die Uricase-Aktivität im Laufe der Zeit stark zu und zwar von 0,030 E nach 3 Tagen auf 0,140 nach 11 Tagen (Regressionsgleichung $Y = - 0,008 + 0,0129 X$).

In Abb. 12 sind die Regressionsgeraden sowohl der Uricase-Aktivitäten (U) wie der Harnsäuregehalte (H) der Imagines von Sevelen (+), *white* (w) und *brown* (bw) bei Standardfutter (St), Zucker-Futter (Z) und Zucker-Glykokoll-Glutamin-Futter (ZAm) nochmals aufgetragen. Aus dieser Abbildung lassen sich folgende Ergebnisse ablesen:

1. Die Uricase-Aktivität auf Standard-Futter steigt bei Sevelen leicht an (U + St), bei *white* (UwSt) und *brown* (UbwSt) hingegen stark. Bei Standardfutter zeigt sich also bei allen 3 Genotypen eine Zunahme der Uricase-Aktivität im Laufe der Zeit. Die Neigung der Regressionsgeraden ist bei w und bw praktisch gleich (der Unterschied der Steigungen ist statistisch nicht gesichert). In ent-

sprechenden Zeitpunkten verläuft die Regressionsgerade bei w um etwa 0,035 E höher als bei bw .

2. Die Uricase-Aktivität auf Zucker-Glykokoll-Glutamin-Futter nimmt bei w zu ($UwZAm$), bei Sevelen ($U + ZAm$) hingegen ab.

3. Vergleicht man die Winkel zwischen den Uricase-Regressionsgeraden von Standardfutter und Zucker-Glykokoll-Glutamin-Futter bei w einerseits ($UwSt$ — $UwZAm$) und beim Wildtyp andererseits ($U + St$ — $U + ZAm$), so zeigt sich,

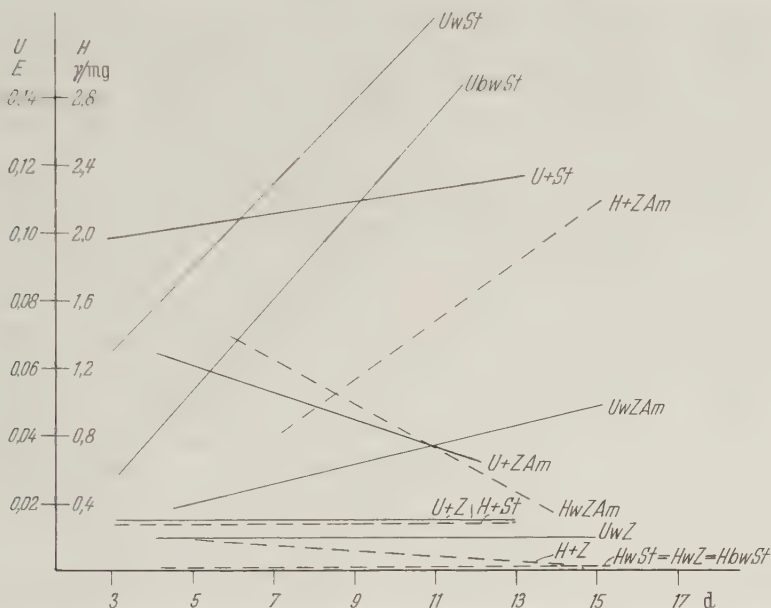


Abb. 12. Regressionsgeraden der Harnsäuregehalte und Uricase-Aktivitäten der Imagines verschiedener Genotypen bei verschiedenem Futter. Ordinate: Uricase-Aktivität (U) in Meßeinheiten (E), Harnsäuregehalt (H) in γ /mg Lebendgewicht. Abszisse: Alter in Tagen (d) nach Schlüpfen der Imagines. $UwSt$: Uricase-Aktivität von *white* auf Standardfutter; $UwZAm$ Uricase-Aktivität von *white* auf Zucker-Glykokoll-Glutamin-Futter; UwZ Uricase-Aktivität von *white* auf Zucker-Futter. $U + St$: Uricase-Aktivität von Sevelen (Wildstamm), auf Standardfutter; $U + ZAm$ Uricase-Aktivität von Sevelen auf Zucker-Glykokoll-Glutamin-Futter; $U + Z$ Uricase-Aktivität von Sevelen auf Zuckerfutter; $UbwSt$ Uricase-Aktivität von *brown* auf Standardfutter; $HwSt$ Harnsäuregehalt von *white* auf Standardfutter; $HwZAm$ Harnsäuregehalt von *white* auf Zucker-Glykokoll-Glutamin-Futter; HwZ Harnsäuregehalt von *white* auf Zuckerfutter; $H + St$ Harnsäuregehalt von Sevelen auf Standardfutter; $H + ZAm$ Harnsäuregehalt von Sevelen auf Zucker-Glykokoll-Glutamin-Futter; $H + Z$ Harnsäuregehalt von Sevelen auf Zuckerfutter; $HbwSt$ Harnsäuregehalt von *brown* auf Standardfutter

daß diese Winkel keine statistisch gesicherte Differenz aufweisen (Winkel bei w : $32^\circ 54'$, bei $+$: $29^\circ 20'$). Sie dürfen also als gleich betrachtet werden, d. h. die Uricase-Aktivität nimmt im gleichen Maße ab bei $+$ und w , wenn an Stelle von Standardfutter Zucker-Glykokoll-Glutamin gefüttert wird. Die Ursache dieser geringeren Aktivität bei Zucker-Aminosäurenfutter könnte darin zu suchen sein, daß bei dieser Art Futter die Uricase-Bildung gering ist, weil noch andere stimulierende Faktoren notwendig sind.

4. Sowohl bei $+$ wie bei *white* bleibt die Uricase-Aktivität bei Zucker-Fütterung ($U + Z$ bzw. UwZ) konstant auf einem geringen Niveau. Auch hier läßt sich vermuten, daß mangels Aufbaustoffen die Uricase-Bildung weitgehend unmöglich gemacht wird.

VIII. Diskussion

In Abb. 13 sind je von einem Punkt aus aufgetragen: Die einanderentsprechenden Regressionsgeraden für Harnsäuregehalt (H) und Uricase-Aktivität (U) sowie die Additionsgerade (A) dieser beiden Geraden. Die Additionsgeraden wurden so konstruiert, daß die Winkel der Regressionsgeraden addiert wurden. Die Winkel wurden in herkömmlicher Weise als positiv gewertet, wenn sie in

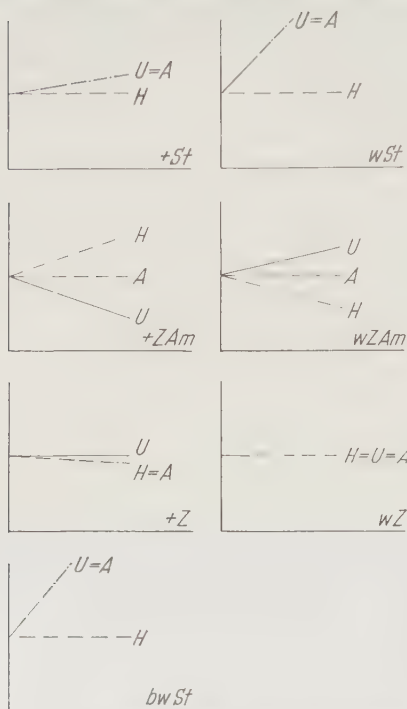


Abb. 13. Vergleich der Regressionsgeraden der Uricase-Aktivitäten (U) und der Harnsäuregehalte (H) von verschiedenen Genotypen bei verschiedenem Futter. A Additionsgerade von $U + H$. $+ St$: Wildstamm (Sevelen) auf Standardfutter; $+ ZAm$: Wildstamm (Sevelen) auf Zucker-Glykokoll-Glutamin-Futter; $+ Z$: Wildstamm (Sevelen) auf Zuckerrfutter; wSt : *white* auf Standardfutter; $wZAm$: *white* auf Zucker-Glykokoll-Glutamin-Futter; wZ : *white* auf Zuckerrfutter; $bwSt$: *brown* auf Standardfutter

denken, daß der zunehmende Harnsäuregehalt im Körper der $+Imago$ dadurch zu erklären ist, daß mit zunehmendem Alter weniger Harnsäure durch Uricase abgebaut wird.

3. Der Harnsäuregehalt nimmt bei $+$ (Zuckerrfutter, $+Z$) im Alter von 9–15 Tagen ab, die Uricase-Aktivität bleibt konstant. Die Abnahme im Harnsäuregehalt dürfte hier ein Hungereffekt sein, d.h. es stehen den Fliegen keine Stickstoffverbindungen als Nahrung zur Verfügung, so daß weniger Harnsäure gebildet wird.

4. Der Harnsäuregehalt bei *white* (Standardfutter, wSt) nimmt nach dem Schlüpfen rasch ab, so daß nach 4 Tagen keine Harnsäure mehr im Körper nach-

Gegenuhrzeigersinn von der Horizontalen abweichen, als negativ, wenn die Abweichung negativ war. Die Winkel der Regressionsgeraden der Uricase-Aktivitäten wurden gleich groß wie in Abb. 12 gewählt, die Winkel der Harnsäureregressionsgeraden wurden nur halb so groß gewählt wie diejenigen in Abb. 12.

Die Additionsgeraden illustrieren folgende Beziehungen zwischen Harnsäure und Uricase:

1. Der Harnsäuregehalt im Körper der $+Imago$ (Wildtyp) bei Standardfutter ($+St$) ist konstant, die entsprechende Uricase-Aktivität nimmt leicht zu. Es besteht hier offenbar ein Gleichgewicht zwischen Harnsäurebildung, Harnsäureausscheidung, Harnsäuregehalt im Körper und Harnsäureabbau durch Uricase, wobei der im Laufe der Zeit leicht erhöhte Harnsäureabbau durch Uricase vermutlich durch erhöhte Harnsäurebildung kompensiert wird.

2. Der Harnsäuregehalt beim Wildtyp nimmt mit der Zeit zu bei Zucker-Glykokoll-Glutamin-Futter ($+ZAm$), die Uricase-Aktivität während der gleichen Zeit ab. Die Winkel der Regressionsgeraden sind (bei dem gewählten Maßstab) ziemlich genau entgegengesetzt gleich, d.h. die Additionsgerade verläuft annähernd horizontal. Es läßt sich also

weisbar ist. Die Uricase-Aktivität nimmt stark zu. Das Gleichgewicht zwischen Bildung, Ausscheidung und Abbau der Harnsäure, das beim Wildtyp besteht, scheint so verschoben, daß Ausscheidung (Abb. 9) und Abbau alle gebildete Harnsäure aus dem Körper verschwinden lassen.

5. Bei Zuckerfütterung (*wZ*) weist *w* vom 4.—15. Tag nach dem Schlüpfen ebenfalls keine Harnsäure im Körper auf. Die Uricase-Aktivität ist konstant, aber sehr gering. Offenbar genügen hier der Abbau durch Uricase und die Harnsäureausscheidung, um die wenige Harnsäure, die bei Zuckerfütterung gebildet wird, aus dem Körper verschwinden zu lassen.

6. Der Harnsäuregehalt bei *w* zeigt bei Zucker-Glykokoll-Glutamin-Futter (*wZAm*) vom 6.—15. Tag eine ständige Abnahme. Die Uricase-Aktivität nimmt hingegen vom 4.—13. Tage zu. Vergleicht man die Regressionsgerade der Harnsäureabnahme mit der Regression der Uricase-Zunahme, so zeigt sich, daß sie ebenfalls (entsprechend dem Wildtyp) entgegengesetzt gleich große Steigungen aufweisen, die Additionsgerade verläuft also annähernd horizontal. Die Abnahme des Harnsäuregehaltes im Körper der *white*-Imago läßt sich also durch die Zunahme der Uricase-Aktivität erklären.

7. Bei *bw* (Standardfutter, *bwSt*) sind die Verhältnisse genau entsprechend wie bei *white*. Es läßt sich also auch hier folgern, daß die Harnsäure aus dem Körper der Imago verschwindet, weil der größte Teil durch Uricase abgebaut wird.

Im vorhergehenden konnte also wahrscheinlich gemacht werden, daß die Verschiedenheiten im Harnsäuregehalt der verschiedenen Genotypen durch die unterschiedliche Uricase-Aktivität verursacht werden. Mit dieser Erklärung lassen sich die Ergebnisse der Transplantationsversuche (S. 47) leicht in Einklang bringen. Implantate von Wildaugen bzw. Malpighischen Gefäßen des Wildtyps können den Harnsäuregehalt im *white*-Wirtskörper nicht beeinflussen, da eventuell gebildete geringe Mengen von Harnsäure durch die starke Uricase-Aktivität von *w* sofort abgebaut würden. Der Hypoxanthingehalt von *rosy-white*-Tieren, wie auf S. 46 dargestellt, stützt die Theorie ebenfalls: Da mangels Xanthindehydrogenase keine Harnsäure gebildet wird, spielt die Uricase auch keine Rolle. Hypoxanthin erscheint also trotz des *white*-Faktors im Körper, das *white*-Gen bewirkt keinen Verlust der Speicherfähigkeit von Exkreten.

Weiterhin ungeklärt bleiben dagegen die Zusammenhänge zwischen Pterinstoffwechsel und Harnsäurestoffwechsel. Einerseits konnte gezeigt werden, daß das Verschwinden der Harnsäure aus dem Körper der *white*- bzw. *brown*-Imago auf den Abbau durch Uricase zurückzuführen ist. Vorläufige Versuche ließen jedoch für das Verschwinden der Pterine nichts Ähnliches erkennen. Ein direkter Zusammenhang zwischen Pterinsynthese und Harnsäurebildung scheint also nicht zu bestehen. Andererseits fällt auf, daß sowohl *white* wie *brown* nicht zur Bildung von roten Augenpigmenten befähigt sind und daß ebenfalls beide Mutanten eine starke, im Laufe der Zeit ansteigende Uricase-Aktivität aufweisen. Möglicherweise besteht also ein Zusammenhang zwischen Pterinsynthese und Uricase-Aktivität.

Zusammenfassung

1. Es wurde der Harnsäuregehalt von Puppen und Imagines eines Wildstammes (Sevelen) von *Drosophila melanogaster* und der Mutanten *white*, *brown*, *sepiaoid* und *sepia* im Laufe der Entwicklung studiert. In schlüpfreifen Puppen

ergibt sich für den Harnsäuregehalt der untersuchten Genotypen folgende Reihe: $w > se > + = sed > bw$. Nach dem Schlüpfen bleibt die Harnsäuremenge in der Imago konstant beim Wildtyp, er sinkt nach 4 Tagen auf Null bei w und bw .

2. Implantierte Wildaugen oder Malpighische Gefäße von Wildlarven bewirken keine Erhöhung des Harnsäuregehaltes der *white*-Wirt.

3. Fütterung von Imagines mit einer Lösung von Zucker-Glykokoll-Glutamin führt sowohl beim Wildtyp wie bei *white* zu einer Erhöhung des Harnsäuregehalts gegenüber Standardfutter. Beim Wildtyp nimmt der Harnsäuregehalt bei Fütterung mit Zucker-Glykokoll-Glutamin im Laufe der Zeit zu, bei w ab.

4. Fütterung von *white*-Imagines mit Zucker-Glykokoll ergibt keine, Fütterung mit Zucker-Glutamin nur eine geringe Zunahme des Harnsäuregehalts gegenüber Standardfutter.

5. Fütterung von *white*-Imagines mit Zucker-Glykokoll-Asparagin bewirkt ebenfalls eine Zunahme des Harnsäuregehalts, die jedoch geringer ist als bei Zucker-Glykokoll-Glutamin-Futter.

6. Das Studium der Exkrete von Wildtyp-Fliegen (+), sowie von *white*- und *brown*-Imagines zeigt, daß auch nach etwa 9 Tagen nach dem Schlüpfen noch Harnsäure und fluoreszierende Stoffe ausgeschieden werden und zwar sowohl von + wie von w und bw . Offenbar sind *white* und *brown* auch als Imago zur Synthese von fluoreszierenden Stoffen und zur Bildung von Harnsäure fähig.

7. Die Uricase-Aktivität von Wildfliegen und den Mutanten *white* und *brown* wurde bei verschiedenem Futter (Standardfutter, Zucker, Zucker-Glykokoll-Glutamin) bestimmt. Die Aktivität bei Standardfutter bleibt mehr oder weniger konstant beim Wildtyp, sie steigt stark an im Laufe der Zeit bei *white* und *brown*. Bei Zucker-Futter ist die Uricase-Aktivität sowohl bei + wie bei w konstant und sehr gering. Die Aktivität nimmt bei Fütterung mit Zucker-Glykokoll-Glutamin ab im Laufe der Zeit beim Wildtyp, sie nimmt zu bei *white*, wenn auch weniger stark als bei Standardfutter.

8. Die aufgetretenen Unterschiede im Harnsäuregehalt der verschiedenen Genotypen lassen sich durch die unterschiedliche Uricase-Aktivität erklären.

a) Der dauernd gleich hoch bleibende Harnsäuregehalt in der Wildimago bei Standardfutter entspricht einer konstant bleibenden Uricase-Aktivität.

b) Das Verschwinden der Harnsäure aus dem Körper der *white*- bzw. *brown*-Imago (Standardfutter) läßt sich auf die stark gesteigerte Uricase-Aktivität zurückführen.

c) Bei Zucker-Glykokoll-Glutamin-Futter entspricht dem Anstieg der Harnsäure im Körper der +Imago die im Laufe der Zeit abnehmende Uricase-Aktivität. Ebenso entspricht dem sinkenden Harnsäuregehalt der w -Imago eine zunehmende Uricase-Aktivität.

Meinem verehrten Lehrer, Herrn Prof. Dr. E. HADORN, danke ich herzlich für die Überlassung des Themas und für die Leitung dieser Arbeit, sowie für die Ausführung der Transplantationen. Für seine wertvollen Ratschläge bezüglich der Fütterungsversuche bin ich Herrn Prof. Dr. F. LEUTHARDT zu Dank verpflichtet. Den Herren Prof. Dr. H. BURLA und Dr. A. KÄLIN danke ich für ihre Ratschläge bei der statistischen Auswertung der Resultate.

Literatur

- ALBERT, A.: The transformation of purines into pteridines. *Biochem. J.* **65**, 124—127 (1957).
 ANDERSON, D., and R. L. PATTON: In vitro studies of uric acid synthesis in insects. *J. exp. Zool.* **128**, 443—451 (1955).

- BALDWIN, E.: Biochemie, Einführung in ihre Dynamik. Weinheim: Verlag Chemie 1957.
- BROWN, A. W. A.: The excretion of ammonia and uric acid during the larval life of certain muscoid flies. J. exp. Biol. **13**, 131—139 (1936).
- BUCHANAN, J. M., J. C. SONNE and A. M. DELLUVA: Biological precursors of uric acid. II. The role of lactate, glycine and carbon dioxide as precursors of the carbon chain and nitrogen atom 7 of uric acid. J. biol. Chem. **173**, 81—98 (1948).
- DANNEEL, R., u. B. ESCHRICH-ZIMMERMANN: Beziehungen zwischen dem Vorkommen von Harnsäure und verschiedenen Pterinen bei *Drosophila melanogaster*. Z. Naturforsch. **12b**, 730—732 (1957).
- FORREST, H. S., E. GLASSMAN and H. K. MITCHELL: Conversion of 2-amino-4 hydroxypteridine to isoxanthopterin in *Drosophila melanogaster*. Science **124**, 725—726 (1956).
- GOLDTWAITH, D. A., R. A. PEABODY and G. R. GREENBERG: The biosynthesis of the purin ring, in a Symposium on amino acid metabolism, pp. 765—781. Baltimore: John Hopkins Press 1955.
- GRAF, G. E.: Uric acid in *Drosophila melanogaster*. Genetics **44**, 513 (1959).
- HADORN, E.: Approaches to the study of biochemical and developmental affects of mutations. Caryologia, Suppl. to **6**, 326—337 (1954a).
- Ontogenetische Änderungen im Gehalt an Isoxanthopterin bei verschiedenen Genotypen von *Drosophila melanogaster*. Experientia (Basel) **10**, 483—484 (1954b).
- Erbkonstitution und Merkmalsbildung. Verh. schweiz. naturforsch. Ges. **1956**, 52—66.
- Contribution to the physiological and biochemical genetics of pteridines and pigments in insects. Proc. X. Int. Congr. Genetics, 1959, Vol. 1, pp. 337—354.
- , u. A. KÜHN: Chromatographische und fluorometrische Untersuchungen zur biochemischen Polyphänie von Augenfarbgenen bei *Ephestia kühniella*. Z. Naturforsch. **8b**, 582—589 (1953).
- , u. R. KÜRSTEINER: Unterschiede in den Exkretstoffen bei verschiedenen Genotypen von *Drosophila melanogaster*. Arch. Klaus-Stift. Vererb.-Forsch. **30**, 494—498 (1955).
- , and I. SCHWINCK: A mutant of *Drosophila* without isoxanthopterin which is non-autonomous for the red eye pigments. Nature (Lond.) **177**, 940—941 (1956a).
- — Fehlen von Isoxanthopterin und Nichtautonomie in der Bildung der roten Augenpigmente bei einer Mutante (*rosy*²) von *Drosophila melanogaster*. Z. indukt. Abstamm. u. Vererb.-Lehre **87**, 528—553 (1956b).
- HEIDERMANNS, C.: Der Exkretstoffwechsel der wirbellosen Tiere. Naturwissenschaften **26**, 263—267, 279—282 (1938).
- HELLER, J., and M. M. JEZEWSKA: The synthesis of uric acid in the Chinese tussur moth (*Antherea pernyi*). Bull. Acad. pol. Sci., Cl. 2 **7**, 1—4 (1959).
- HOLIDAY, E. R., and E. A. JOHNSON: Location of paper chromatogram spots of purin and pyrimidin derivatives in UV-light. Nature (Lond.) **163**, 216 (1949).
- HUDSON, B. W., A. H. BARTEL and R. CRAIG: Pteridines in the Milkweed Bug *Oncopeltus fasciatus* (Dallas). Quantitative determination of pteridine content of tissues during growth. J. insect. Physiol. **3**, 63—73, 1959.
- KALCKAR, H.: Differential spectrophotometry of purin compounds by means of specific enzymes. III. Studies of enzymes of purine metabolism. J. biol. Chem. **167**, 461 (1947).
- LEIFERT, H.: Exkretstoffwechsel bei Eiern, Raupen und Puppen von *Antherea pernyi*. Zool. Jb., Abt. allg. Zool. u. Physiol. **55**, 131—190 (1935).
- MITCHELL, H. K., E. GLASSMAN and E. HADORN: Hypoxanthine in *rosy* and *maroon-like* mutants of *Drosophila melanogaster*, Science **129**, 268—269 (1959).
- MORITA, T.: Purine catabolism in *Drosophila melanogaster*. Science **128**, 1135 (1958).
- NELSON, W. A.: Purine excretion by the Sheep Ked, *Melophagus ovinus* (L.). Nature (Lond.) **182**, 115 (1958).
- SCHNEIDER, W. C., and G. H. HOGEBOM: Intracellular distribution of enzymes. IX. Certain purine-metabolizing enzymes. J. biol. Chem. **195**, 161—166 (1952).
- SHEMIN, D., and D. J. RITTENBERG: On the utilization of glycine for uric acid synthesis in man. J. biol. Chem. **167**, 875—876 (1947).
- SONNE, J. C., J. M. BUCHANAN and A. M. DELLUVA: Biological precursors of uric acid I. The role of lactate, acetate and formate in the synthesis of ureide groups of uric acid. J. biol. Chem. **173**, 69—79 (1948).

- SONNE, J. C., F. LIN and J. M. BUCHANAN: The role of N^{15} glycine, glutamine, aspartate and glutamate in hypoxanthin synthesis. J. Amer. chem. Soc. **75**, 1516—1517 (1953).
- TAIRA, T., and S. NAWA: Microdetermination of uric acid in *Drosophila melanogaster* during metamorphosis. Ann. Report. Nat. Inst. Genetics Japan No 7, 35—36, 1956.
- — No direct metabolic relation between pterines and uric acid, flavins or folic acid in *Drosophila melanogaster*. Jap. J. Genet. **33**, 42—45 (1958).
- TERZIAN, L. A., F. IRREVERRE and N. STAHLER: A study of nitrogen and uric acid patterns in the excreta and body tissues of adult *Aedes aegypti*. J. insect. Physiol. **1**, 221—228 (1957).
- TRUSZKOWSKI, R., and S. CHAJKINOWNA: Nitrogen metabolism of certain invertebrates. Biochem. J. **29**, 2361—2365 (1935).
- VISCHER, E., and E. CHARGAFF: The separation and quantitative estimation of purines and pyrimidines in minute amounts. J. biol. Chem. **176**, 703—714 (1948).
- WIGGLESWORTH, V. B.: Principles of Insect Physiology. London 1942.

Dr. PAUL AUF DER MAUR,
 Zoologisch-vergl. anatomisches Institut der Universität Zürich (Schweiz)